



D2

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, 15/86, 5/10, C07K 14/47, 14/82, A61K 39/395, 48/00, C12Q 1/68, G01N 33/574, 33/68		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/22695 (43) Date de publication internationale: 26 juin 1997 (26.06.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/02061</p> <p>(22) Date de dépôt international: 20 décembre 1996 (20.12.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/15146 20 décembre 1995 (20.12.95) FR 96/04853 18 avril 1996 (18.04.96) FR </p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): FONDATION JEAN DAUSSET-CEPH [FR/FR]; 27, rue Juliette-Dodu, F-75010 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): TALERMAN, Adam [FR/FR]; 12, rue de la Chaise, F-75007 Paris (FR). AMSON, Robert [FR/FR]; 10, rue Gay-Lussac, F-75005 Paris (FR). COHEN, Daniel [FR/FR]; 3, rue de l'Orme-au-Mesnier, F-91600 Savigny-sur-Orge (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> </p>	
<p>(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES, PROTEINS, DRUGS AND DIAGNOSTIC AGENTS FOR TREATING CANCER</p> <p>(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES, PROTEINES, MEDICAMENTS ET AGENTS DIAGNOSTIQUES UTILES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A nucleotide sequence corresponding to a gene comprising (a) one of sequences SEQ ID 1 to 11, or an equivalent gene which comprises (b) a sequence hybridisable with one of the sequences of (a), (c) a sequence at least 80 % homologous with (a) or (b), or (d) a sequence coding for a protein encoded by a gene according to (a), (b) or (c), or for an equivalent protein, and the use thereof, in particular for controlling cancer as well as for therapeutic follow-up. These genes are in the TSAP (tumor suppressor activated pathway) group, designated TSAP 1 to TSAP 8 and TSAP 3 human (or HUMSIAH) and in TSIP (tumor suppressor inhibited pathway) group, designated TSIP 1 and TSIP 2, both types of genes corresponding to sequences activated or inhibited, respectively, during cellular apoptosis, particularly that induced by p53.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne une séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant: (a) une séquence selon l'une des IND. SEQ 1 à 11 ou un gène équivalent qui comporte: (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a), (c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou (d) une séquence codant pour une protéine codée par une gène selon (a), (b) ou (c) ou pour un protéine équivalente, et leur application notamment dans la suppression du cancer ainsi que dans le suivi thérapeutique. Ces gènes regroupés en TSAP (tumor suppressor activated pathway) et dénommés TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain (ou HUMSIAH), et en TSIP (tumor suppressor inhibited pathway) et dénommés TSIP 1 et TSIP 2, ces deux types de gènes correspondant respectivement à des séquences induites ou inhibées lors de l'apoptose cellulaire, notamment celles induites par p53.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES, PROTÉINES, MÉDICAMENTS ET AGENTS
DIAGNOSTICS UTILES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER.**

La présente invention concerne la mise en évidence de gènes impliqués dans les voies moléculaires de la suppression tumorale et 5 l'utilisation des gènes ainsi mis en évidence pour le traitement de certains dysfonctionnements géniques, notamment les cancers.

La présente invention a été rendue possible par l'isolement d'ADNc correspondant à des ARN messagers exprimés ou réprimés lors du processus d'apoptose induit par le gène suppresseur p53.

10 Une analyse globale des événements moléculaires intervenant au cours du cycle cellulaire lors du développement et de l'apoptose cellulaire est nécessaire pour mieux comprendre l'importance du gène p53 dans le processus de suppression tumorale ou, au contraire, de cancérisation.

15 La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale est un processus qui se déroule en plusieurs étapes et qui nécessite une suite d'événements moléculaires. Au niveau physiologique, ces événements se traduiront par une indépendance de la cellule tumorale vis-à-vis des signaux extérieurs ainsi que par une dérégulation interne menant à une croissance incontrôlée.

20 Deux groupes de gènes sont responsables de cette transformation dite "maligne", d'une part, les oncogènes, d'autre part, les gènes suppresseurs ou anti-oncogènes. Les oncogènes, en raison de leur dérégulation dans le cancer (résultant le plus souvent d'une mutation ou d'une translocalisation) induiront un signal positif qui favorisera la 25 croissance néoplasique. Au contraire, les gènes suppresseurs, du fait de leur délétion, de l'absence de leur expression par mutation du promoteur, par exemple, ou encore de mutations qui modifieront la structure et la fonction de la protéine, seront incapables dans le cancer de fournir le signal qui lui, normalement, devrait freiner cette croissance anormale. En conséquence, le 30 dysfonctionnement des gènes suppresseurs contribue à la transformation néoplasique.

L'objet de la présente invention est l'isolement de gènes ayant normalement une action dans la suppression tumorale et dont il sera alors possible de surveiller et de traiter les éventuels dysfonctionnements.

35 En particulier, l'isolement de ces gènes permet d'avoir recours à une thérapie génique de remplacement ou bien à la synthèse d'agents pharmacologiques, protéiques ou non protéiques, qui, directement ou

indirectement, par leur action sur les promoteurs, induiront l'activation et l'expression de ces gènes, ou encore la synthèse d'agents pharmacologiques qui permettront de mimer l'effet physiologique de ces gènes suppresseurs.

L'objectif final est, soit d'inhiber la croissance tumorale, ou mieux, 5 d'induire le processus apoptotique de ces cellules tumorales, c'est-à-dire de conduire les cellules tumorales à se "suicider".

La présente invention concerne la mise en évidence de gènes qui sont impliqués dans cette apoptose. En effet, chaque cellule possède en elle un programme de mort physiologique. Il s'agit également d'un processus 10 physiologique qui est impliqué dans le développement afin de maintenir l'homéostasie du corps et de ne pas voir des proliférations cellulaires anormales s'établir, même si, au demeurant, elles n'ont pas de caractère malin.

L'un des gènes suppresseurs les plus importants impliqués dans 15 l'apoptose est le gène p53. Dans sa fonction normale, ce gène contrôle la croissance cellulaire et le processus d'apoptose ; en particulier, c'est ce gène qui bloque la croissance cellulaire et qui doit induire le processus apoptotique afin d'éviter le développement d'un cancer. On a ainsi mis en évidence que des souris nullizygotes pour le p53 étaient beaucoup plus 20 sensibles à la formation de tumeurs. On a également mis en évidence le fait que, dans les cancers, le gène p53 était très souvent altéré et conduisait à la production de protéines incapables de véhiculer le message d'apoptose.

C'est cette particularité qui a été mise en oeuvre dans le cadre de la présente invention.

En effet, la présente invention repose sur la constatation qu'il 25 n'est pas possible, ou du moins qu'il paraît très difficile, de mettre en place une thérapie de substitution directe lors d'un dysfonctionnement du gène p53. En effet, le p53 muté comme il l'est dans le cancer va annuler l'effet physiologique du p53 normal.

Il a donc fallu renoncer, du moins dans un premier temps, à une 30 thérapie de substitution agissant directement au niveau de p53.

La présente invention s'est donc attachée à étudier les gènes situés en aval de p53 afin de "bipasser" la difficulté évoquée précédemment.

Afin d'isoler les gènes activés ou inhibés par le p53 normal (wild-type p53) on a effectué un ratissage global de l'expression des gènes dans une cellule induite en apoptose et dans la même cellule maligne, plus 35 particulièrement dans une cellule exprimant le p53 normal dans sa fonction

et dans une cellule exprimant le p53 muté dont la fonction est oncogénique. La comparaison des gènes exprimés (ARN messagers exprimés dans les deux types de cellule) a permis de mettre en évidence des gènes exprimés différemment, c'est-à-dire exprimés dans l'une des cellules alors qu'ils ne le sont pas dans l'autre (les gènes peuvent être activés ou inhibés).

On en déduit aisément que ces gènes sont impliqués dans le processus de cancérisation, dans un cas par leur absence, et, dans l'autre cas, par leur présence.

Pour cette étude différentielle, la méthode utilisée est la méthode décrite en 1992 par Liang et Pardee (*Differential display of eucaryotic mRNA by mean of a polymerase chaine reaction*).

Jusqu'à présent, l'isolement des gènes impliqués dans la suppression était effectué soit par clonage positionnel, soit par l'emploi des doubles hybrides. La première méthode permettait, par un calcul statistique, de calculer la plus haute probabilité où pouvait se localiser, au niveau chromosomique, un gène suppresseur candidat pour un type bien particulier de cancer, surtout ceux d'origines familiales. Le système de doubles hybrides permet d'isoler une à une les protéines qui-interagissent avec un gène donné.

L'approche du problème selon la présente invention a permis d'isoler des séquences directement reliées à une fonction. Dès lors, au contraire du séquençage aléatoire des EST, les séquences sont des séquences dont la fonction est connue et qui sont impliquées dans le processus d'apoptose induit par le gène suppresseur p53.

De façon plus précise, cette méthode a été utilisée sur un modèle cellulaire décrit par Moshe Oren, il s'agit de cellules myeloïdes tumorales de souris qui ont été transfectées par un mutant stable du gène p53. En fait, l'expression de ce gène est thermosensible, c'est-à-dire que dans des conditions de culture cellulaire à 37°C la protéine produite est une protéine mutée, c'est-à-dire qu'elle ne peut jouer le rôle de suppresseur de tumeur et donc que la lignée cellulaire correspondante se développe sous forme de cellule maligne, alors qu'à la température de 32°C la protéine p53 exprimée, comme la protéine naturelle, est capable de jouer le rôle de suppresseur et empêche la lignée cellulaire correspondante de devenir maligne.

Cette étude systématique a permis de mettre en évidence les gènes impliqués dans la cascade de suppression induite par p53.

C'est pourquoi la présente invention concerne ces nouvelles séquences et les gènes les comportant ainsi que l'utilisation de ces séquences, tant au niveau du diagnostic qu'au niveau de la thérapie, de même que pour la réalisation de modèles destinés à tester des produits anti-cancéreux.

5 La présente invention concerne tout d'abord une séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :

- (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 1 à 10 ou un gène équivalent qui comporte :
 - (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
 - 10 (c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou
 - (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,
- et leur application notamment dans la suppression du cancer ainsi que dans
15 le suivi thérapeutique.

De plus, la présente invention concerne un gène humain impliqué dans la cascade de suppression induite par p53 ainsi que l'utilisation des séquences de ce gène, tant au niveau du diagnostic qu'au niveau de la thérapie, de même que pour la réalisation de modèles destinés à tester des
20 produits anti-cancéreux ainsi que leur application à titre d'agent antiviral.

La présente invention concerne donc également une séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :

- (a) une séquence selon l'IND.SEQ 11 correspondant au gène TSAP 3 humain ou HUMSIAH (Human Homologue of the Drosophila seven in absentia gene), ou un gène équivalent qui comporte :
- (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
- (c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou
- (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,

30 et leur application notamment dans la suppression du cancer ainsi que dans le suivi thérapeutique.

Concernant les séquences 1 à 11, la présente invention couvre aussi bien la séquence nucléotidique correspondant au gène entier que des fragments de ce gène, notamment lorsqu'ils codent pour une protéine équivalente comme cela sera décrit ci-après.

Les séquences nucléotidiques peuvent être aussi bien de l'ADN que de l'ARN ou des séquences dans lesquelles certains des nucléotides sont non naturels, soit pour améliorer leurs propriétés pharmacologiques, soit pour permettre leur identification.

5 Les séquences mentionnées en (b) (pour les IND.SEQ 1 à 11) sont essentiellement les séquences complémentaires totales ou partielles (notamment pour les cas évoqués précédemment).

10 Les séquences (a) et (b) (pour les IND.SEQ 1 à 10) permettent non seulement l'accès au gène murin dont elles sont issues, mais également aux gènes humains correspondant par homologie.

15 Ainsi, l'invention concerne également les séquences nucléotidiques des gènes présentant une forte homologie avec les gènes mentionnés précédemment, de préférence une homologie supérieure à 80 % sur les parties essentielles desdits gènes, soit en général au moins 50 % de la séquence, de préférence l'homologie sera sur ces parties supérieure à 90 %.

20 Enfin, lorsque lesdits gènes codent pour une protéine, la présente invention concerne également les séquences codant pour la même protéine, compte tenu de la dégénérescence du code génétique, mais également pour les protéines équivalentes, c'est-à-dire produisant les mêmes effets, notamment les protéines délétées et/ou ayant subi des mutations ponctuelles.

Les séquences selon la présente invention sont plus particulièrement les séquences qui sont induites ou inhibées lors de l'apoptose cellulaire, notamment celles induites par p53.

25 Lesdits gènes sont regroupés en TSAP ou "Tumor Suppressor Activated Pathway" et dénommés de TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain, correspondant aux IND.SEQ 1 à 8 et 11 (HUMSIAH) respectivement, et en TSIP ou "Tumor Suppressor Inhibited Pathway" et dénommés TSIP 1 et TSIP 2, correspondant aux IND.SEQ 9 et 10.

30 Les caractéristiques des séquences correspondent aux IND.SEQ 1 à 10 sont rassemblées dans le tableau ci-annexé.

Les séquences nucléotidiques correspondant aux gènes TSAP (y compris le TSAP 3 humain ou HUMSIAH), sont des séquences exprimées lors du processus d'apoptose alors que lorsqu'ils ne sont pas exprimés le processus d'oncogénèse se poursuit. Il est donc intéressant :

- 35 - de détecter toute anomalie dans le gène correspondant, laquelle peut conduire à une plus grande susceptibilité à l'oncogénèse, et
- de pouvoir prévoir une thérapie de remplacement.

Il faut d'ailleurs rappeler que ces gènes peuvent intervenir dans d'autres processus que les processus oncogènes ; en effet, p53 est en quelque sorte le gardien de l'intégrité du génome, dans ces conditions les gènes TSAP ou TSIP sont sans doute également impliqués dans cette fonction de contrôle, 5 c'est donc l'ensemble des altérations possibles du génome qui peuvent être redéposables de la détection et de la thérapie précédente. Au contraire, les gènes TSIP sont exprimés lors de l'oncogénèse et non lors de l'apoptose, il est donc là aussi intéressant de détecter l'éventuelle anomalie des TSIP et également de prévoir une thérapie d'inhibition/blocage.

10 La thérapie de remplacement pourra être effectuée par thérapie génique, c'est-à-dire en introduisant le gène TSAP avec les éléments qui permettent son expression *in vivo*. Les principes de la thérapie génique sont connus. On peut utiliser des vecteurs particuliers, viraux ou non viraux, par exemple des adénovirus, rétrovirus, virus herpès ou poxvirus. La plupart du temps ces vecteurs sont utilisés sous forme défectifs qui serviront de véhicules d'expression de TSAP avec ou sans intégration. Les vecteurs peuvent être également synthétiques, c'est-à-dire mimer des séquences virales, ou bien être constitués par de l'ADN ou de l'ARN nu selon la technique développée notamment par la société VICAL

15 20 Dans la plupart des cas, il faudra prévoir des éléments de ciblage assurant une expression spécifique des tissus ou organes, en effet, il n'est pas possible d'envisager d'activer un phénomène d'apoptose incontrôlé.

La présente invention concerne donc l'ensemble des vecteurs décrits précédemment.

25 La présente invention concerne également les cellules transformées par un vecteur d'expression tel que décrit précédemment ainsi que la protéine pouvant être obtenue par culture de cellules transformées.

30 35 Les systèmes d'expression pour produire des protéines peuvent être aussi bien des systèmes eucaryotes tels que les vecteurs précédents que des systèmes procaryotes dans des cellules de bactéries.

L'un des intérêts de la présente invention est qu'elle a mis en évidence l'implication de plusieurs gènes dans l'apoptose ; ainsi la surexpression de l'un des gènes par thérapie génique peut, pour certains d'entre eux, ne conduire à l'apoptose que les cellules dans lesquelles s'expriment déjà d'autres gènes dérégulés, c'est-à-dire des cellules malignes.

La présente invention concerne également, à titre de médicament, un composé assurant l'expression cellulaire d'au moins une des séquences

nucléotidiques précédentes lorsqu'elle est induite lors de l'apoptose cellulaire, notamment des gènes TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain, ou au contraire assurant l'inhibition de l'expression cellulaire d'au moins une séquence cellulaire telle que décrite précédemment lorsqu'elle est inhibée 5 lors de l'apoptose cellulaire, notamment TSIP 1 et TSIP 2.

Il est, par exemple, possible de prévoir d'autres approches que la thérapie génique, notamment l'utilisation de séquences nucléotidiques en stratégie sens ou antisens, c'est-à-dire pouvant bloquer l'expression de TSIP ou au contraire, agissant en amont, favorisant l'expression de TSAP.

10 On peut également prévoir une stratégie de remplacement directe par apport de protéines correspondant à TSAP ou d'anticorps inhibiteurs correspondant à TSIP.

15 Enfin, il est possible de prévoir l'utilisation de molécules non protéiques dont l'activité sera d'activer TSAP ou de mimer l'action de son produit d'expression ou bien d'inhiber TSIP ou bien de bloquer l'action de son produit d'expression.

Ces produits peuvent être aisément testés sur les cellules modifiées qui sont décrites dans les exemples en introduisant les produits à tester dans la culture cellulaire et en détectant l'apparition du phénomène apoptotique.
20 Dans les stratégies à ADN, ARN ou protéique les produits sont bien entendu élaborés en fonction des séquences qui sont décrites.

La présente invention concerne en particulier l'utilisation des médicaments précédents en tant qu'agent anti-cancéreux.

Mais, le produit du gène TSAP 3 humain (HUMSIAIII) est également 25 utile comme agent antiviral, comme cela apparaîtra à la lecture de l'exemple 2. La présente invention concerne donc également l'utilisation des médicaments précédents comme agent antiviral.

La présente invention concerne également à titre d'agent de diagnostic pour la détermination de la prédisposition au cancer, tout ou partie 30 des séquences selon l'invention à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification, mais également à titre d'agent de diagnostic pour la détermination de la prédisposition au cancer un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par la séquence selon l'invention ou les anticorps, notamment les anticorps monoclonaux, 35 correspondants, éventuellement après culture.

Les méthodes de diagnostic sont connues, il peut s'agir, par exemple, de techniques de microséquençage des parties variables après

isolement et amplification éventuelle ou des méthodes de détection type RFLP ou d'amplification simple notamment. Les techniques différentielles peuvent, en particulier, permettre de mettre en évidence l'écart entre le TSAP ou TSIP normal et anormal.

5 L'invention concerne également des modèles mettant en oeuvre les séquences précédentes.

Le gène TSAP 3 humain (HUMSIAH) peut être isolé, notamment, en utilisant la méthode PCR ou d'autres méthodes d'amplification en mettant à profit la structure du gène. Il est également possible de synthétiser ce gène 10 par morceau, si nécessaire.

Enfin, l'invention concerne un perfectionnement à la méthode de Liang et Pardee (1) caractérisé en ce que dans l'amplification par PCR on effectue une diminution en palier ("touch down") tel que décrit dans Don et al. (2).

15 D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après faite notamment en se référant aux figures suivantes :

- Figure 1 - Quantification de l'expression différentielle des ARNm utilisant l'imageur 1200 β . Hybridation aux ARNm dérivés des cellules LTR6 à 37°C et des cellules LTR6 après 4 heures à 32°C. Les nombres en ordonnées de 0 à 20 500 correspondent au comptage détecté par 0,15 mm et sont proportionnels au signal d'hybridation.

C1 : ARNm exprimé également en utilisant un clone sans expression différentielle ;

25 C2 : contrôle positif utilisant la Cycline G et montrant l'induction des ARNm correspondant à 32°C ;

MER-LTR : montre l'induction de cette séquence à 32°C ;

TSAP 1 à TSAP 8 : expression différentielle des 8 ARNm activés dans les 4 premières heures suivant l'induction de l'apoptose ;

30 TSIP 1 et TSIP 2 : expression différentielle des 2 ARNm inhibés dans les 4 premières heures suivant l'induction de l'apoptose.

- Figure 2 - Analyse Northern blot.

A : hybridation avec la sonde TSAP 3 ;

B : hybridation avec la sonde siah 1b de souris ;

35 lignes 1 et 2 : ARNm polyA+ de cellules leucémiques myéloïdes M1 (clone S6) cultivées à 37°C et 32°C respectivement ;

lignes 3 et 4 : ARNm polyA+ de cellules LTR6 cultivées à 37°C et 32°C respectivement ;

la flèche indique l'expression différentielle du transcrit 1,9 kb de TSAP 3 - siah 1b de souris ;

panneaux inférieurs : GAPDH ;

C : distribution tissulaire utilisant TSAP 3 comme sonde ;

5 1 : coeur, 2 : cerveau, 3 : rate, 4 : poumon, 5 : foie, 6 : muscle du squelette, 7 : rein, 8 : testicule ;

les flèches indiquent les transcrits de 1,9 et 2,4 kb ;

panneau inférieur : β -actine.

- Figure 3 - Analyse de l'hybridation *in situ* avec la sonde TSAP 3 ;

10 A : cellules M1 incubées pendant 4 heures à 32°C et hybridées avec une sonde antisens TSAP 3 ;

B : cellules LTR6 incubées pendant 4 heures à 32°C et hybridées avec une sonde sens TSAP 3 ;

C : cellules LTR6 incubées à 37°C et hybridées avec une sonde antisens 15 TSAP 3 ;

D à F : cellules LTR6 cultivées à 32°C pendant respectivement 1, 2 et 4 heures et hybridées à une sonde antisens TSAP 3 ;

la barre dans le panneau A : 10 μ m ;

les flèches indiquent l'accumulation des ARNm TSAP 3 dans le cytoplasme.

20 - Figure 4 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSAP 1 et la séquence nucléotidique correspondant à la phospholipase C bêta 4 de rat.

- Figure 5 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSAP 2 et la séquence nucléotidique correspondant à la protéine digitée au zinc (ZFM 1) localisée dans le locus Multiple Endocrine Neoplasia (MEN 1).

25 - Figure 6 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSAP 3 et la séquence nucléotidique correspondant au gène Drosophila seven in absentia (sina).

- Figure 7 - Comparaison entre le produit des gènes sina de différentes espèces, humain (HUMSIAH), murin (MMSIAH 1B) et de drosophile (DROSINA).

30 - Figure 8 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSIP 2 et la séquence d'ADNc du transcript S182 murin du gène AD3 impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

MATERIELS ET METHODES

Cultures cellulaires

35 Cellules de leucémie myéloïde M1 (clone S6) et cellules M1 transfectées de façon stable avec un mutant sensible à la température val 135 p53 (LTR6) (3).

Ces cellules sont cultivées sur milieu RPMI 1640 avec 10 % FCS à 5 % de CO₂ à 37°C. Pour la modification de la température, les cultures sont placées dans un second incubateur à 32°C. Pour tous les essais effectués dans cette étude, les cellules sont testées après 12 et 24 heures pour la présence d'apoptose.

Etude des ADNc différentiels

Pour effectuer les tests dans des conditions expérimentales standards et pour obtenir une reproductivité totale des résultats, les modifications suivantes au protocole d'origine (1) ont été effectuées.

On utilise toujours des ARNm polyA+ purifiés deux fois sur colonne d'oligodT utilisant Fast Track (Invitrogen, San Diego CA). Après transcription réverse (M-MLV Reverse Transcriptase, Gibco BRL) sur 0,05 µg de polyA+ utilisant 20 µM de chacun des dNTP (Boehringer-Mannheim), aucun dNTP additionné n'est ajouté au mélange de PCR final. Un "hot start" à 94°C pendant 5 minutes est effectué avant la PCR (GeneAmp PCR system 9600 Perkin Elmer Cetus). Les échantillons sont refroidis rapidement sur de l'eau glacée. Un "touch down" (2) de 10 cycles de 50°C à 40°C est effectué (94°C 30 secondes - 50°C 1 minute - 72°C 30 secondes), suivi par 35 cycles (94°C 30 secondes - 40°C 1 minute - 72°C 30 secondes) et une extension finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de la PCR sont séparés sur gels de polyacrylamide à 6 % non dénaturant (4). Les gels sont exposés sans séchage. Chaque présentation différentielle est effectuée en comparant M1S6 et LTR6 à 37°C et après 4 heures d'incubation des deux lignées cellulaires à 32°C.

La procédure de présentation différentielle est répétée dans 3 expériences différentes pour confirmer une parfaite reproductibilité.

Les bandes exprimées différemment sont découpées à partir du gel, éluées et réamplifiées (1). Les produits de PCR sont sous-clonés en utilisant le système TA-cloning (Invitrogen, San Diego CA) en suivant les indications fournies.

Pour chaque réaction de ligation, 10 clones recombinants sont séquencés en utilisant le système automatique ABI.

Extraction des ARN, analyses et sondes Northern blots

L'ARN total est extrait avec du Trizol (Life Technologies). Les ARN polyA+ sont préparés en utilisant le kit OligotexdT (Qjagen, CA). 30 µg de l'ARN total ou 2 µg d'ARN polyA+ sont séparés sur agarose 1 %/1 x MOPS / 2 % gel de formaldéhyde, transférés sur membrane de nylon (Hybond N+, Appligène, France) comme cela a été décrit précédemment (5). Les Northern blots sont

hybridés avec des sondes marqués au P³² sur les inserts TSAP et TSIP et lavés comme décrit précédemment (5). Pour vérifier l'induction de la fonction du p53 sauvage, les Northern blots sont hybridés avec une sonde cycline G (6). A titre de contrôle pour la quantité d'ARNm chargée, les blots sont 5 hybridés avec une sonde GAPDH. Différents Northern blots (Clontech CA) sont utilisés dans des conditions identiques et hybridés pour le contrôle avec une sonde β-actine. Les produits de RT-PCR pour LTR6 sont amplifiés en utilisant les amorces siah 1b suivantes : 5'CAGTAAACCACTGAAAAACC3' et 10 5'CAAACCAAAACCAAAACCAC3'. Le produit de PCR sous-cloné est utilisé comme sonde contrôle de siah 1b. Les Northern blots sont exposés pendant 10 jours à - 80°C.

Slot blots

La reproductibilité des résultats obtenus par les analyses Northern blot. Les blots sont préparés (Bio-Rad, Hercules CA) en plaçant les produits 15 de PCR (200 ng de Zeta-Probe Blotting Membranes, Bio-Rad, suivant les instructions du fabricant) de clones TSAP et hybridés avec une sonde ADNc marquée au P³² (Superscript II Gibco-BRL, Life Technologies) correspondant à l'ARN des cellules LTR6 incubées à 37°C et ensuite 4 heures à 32°C. Le produit de PCR du clone contenant la cycline G est également déposé sur les 20 membranes et utilisé comme contrôle positif. Les Slot blots sont exposés une nuit à - 80°C.

Analvse quantitative des images

Celle-ci est effectuée en utilisant un imageur 1200 β (Biospace Instruments, Paris, France) sur les deux Northern blots (pour TSIP 1 et TSIP 25 2) et sur les Slot blots pour tous les contrôles ADNsc et TSAP 1 à 8. Pour l'analyse quantitative représentée dans les graphiques de la figure 1 on soustrait un nombre constant de chaque pic. Cette constante est calculée en mesurant la valeur moyenne du bruit de fond dans les slots qui ne 30 contiennent pas d'ADNc. Les résultats du β imageur ont été obtenus en comptant les slot blots une nuit et en les confirmant par autoradiographie avec des temps variables d'exposition. Ces autoradiogrammes montrent les mêmes variations qualitatives relatives entre les activités à 32°C et à 37°C que les mesures effectuées avec le β imageur.

Hybridation in situ (7, 8)

35 Les cellules sont lavées 3 fois dans un tampon phosphate salin (PBS) "cytospinned" et fixées par du paraformaldéhyde à 4 % dans PBS pendant 10 minutes puis conservées dans l'éthanol à 70 %. Des transcrits

d'ARN marqués à la digoxigénine-11-uridine-5'-triphosphate (DIG) et à la biotine-11-UTP de TSAP 3 sont utilisés dans les analyses suivant la procédure décrite précédemment (Boehringer-Mannheim). Pour la détection des souches marquées à la digoxigénine hybridée les tranches sont incubées 5 dans SAD-10 (10 nm d'anticorps anti-DIG de mouton marqués à l'or à 1/1000 de dilution, Biocell UK). L'analyse est effectuée en utilisant de la microscopie à laser confocal.

EXEMPLE 1

L'étude différentielle des ADNc par la méthode de Liang et Pardee 10 permet de disposer d'un outil très puissant et efficace pour détecter les variations dans l'expression des gènes. Néanmoins, il a fallu modifier le protocole original comme cela a été indiqué précédemment afin d'écartier certains problèmes de reproductibilité observés lorsque l'on applique la méthode telle qu'elle est décrite à l'origine.

15 On a pu mettre en évidence une reproductibilité totale lorsque dans la méthode PCR on introduit un "hot start" suivi par un "touch down".

Les bandes exprimées différemment après isolement et réamplification sont néanmoins souvent contaminées par des bandes provenant des ARN qui migrent dans les régions voisines de l'ADNc, si l'on 20 utilise directement ces sondes sur des Northern blots ceci conduit à des erreurs. On a donc sous-cloné les produits de seconde PCR et fait effectuer les analyses des Northern blots utilisés à défaut de recombinant à sonde simple. Le séquençage systématique d'au moins 10 sous-clones recombinants pour chaque bande sélectionnée a montré qu'il était très efficace pour 25 sélectionner les clones d'intérêt.

Le gène p53 est, dans l'état actuel de nos connaissances, le suppresseur tumoral qui est muté dans le plus grand nombre de cancers d'origines très diverses, et l'utilisation du mutant sensible à la température val-135 p53 s'est déjà montrée précédemment fournir des informations très 30 importantes concernant le fonctionnement du p53 sauvage en induisant, soit l'arrêt de la croissance cellulaire en phase G-1, soit l'initiation du programme de mort cellulaire.

Jusqu'à maintenant, les voies moléculaires en amont et en aval de p53 et qui conduisent à la suppression tumorale étaient encore peu claires.

35 Jusqu'à maintenant un certain nombre de gènes en aval de p53 ont été identifiés, il s'agit notamment de gadd 45, mdm 2, mck, "Mouse endogenous retrovirus" LTR, p21-waf et Cycline G.

La présente invention a permis de mettre en évidence l'existence de 11 gènes qui sont exprimés différentiellement dans les cellules exprimant le p53 sous sa forme suppresseur actif ou bien dans des cellules tumorales exprimant le gène p53 non actif.

5 La figure 1 montre la quantification des signaux d'hybridation correspondant à l'expression différentielle de 8 de ces gènes qui sont activés à 32°C, c'est-à-dire dans lesquels la fonction de p53 sauvage est activée et conduit donc à l'apoptose des cellules, ces gènes qui sont activés seront dénommés ci-après TSAP (pour Tumor Suppressor Activated Pathway), par contre on constate que dans deux expériences 2 gènes exprimés à 37°C sont en partie inhibés à 32°C, ce qui impliquerait qu'ils sont inhibés durant la mort cellulaire programmée, ces gènes ont été dénommés TSIP (pour Tumor Suppressor Inhibited Pathway).

L'analyse des homologies des différentes séquences activées de TSAP 1 à TSAP 3 a montré qu'il s'agissait là de gènes déjà connus. Par contre, les autres ADNc TSAP 4 à TSAP 8 ne montrent aucune homologie significative avec des gènes connus.

Pour l'ADNc TSIP 1 qui est inhibé dans son expression pendant l'apoptose, il ne montre aucune homologie avec des gènes connus.

20 Pour l'ADNc TSIP 2 qui est également inhibé dans son expression pendant l'apoptose, il montre une grande homologie avec le transcript S182 du gène AD3 impliqué dans les voies métaboliques de la maladie d'Alzheimer (Sherrington et al.) (figure 8).

Par conséquent, il est possible d'agir sur les voies métaboliques de la maladie d'Alzheimer en agissant sur les voies métaboliques p53 dépendantes.

La présente invention a donc également pour objet, à titre de médicament, un composé assurant l'expression cellulaire de TSIP 2 destiné au traitement de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'à titre d'agent de diagnostic pour la détermination de la prédisposition à la maladie d'Alzheimer, tout ou partie de la séquence de TSIP 2 à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification ainsi qu'un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par TSIP 2 ou les anticorps, notamment les anticorps monoclonaux correspondants, éventuellement après culture.

35 L'hypothèse que l'on peut faire sur ces gènes inhibés dans leur expression par le p53 sauvage est qu'ils peuvent coder pour des séquences oncogéniques qui seraient régulées en aval du processus de suppression

tumorale ou encore qu'il s'agit de protéines de structure ou du cytosquelette pour lesquelles la régulation en aval de l'expression est concomitante de la mort cellulaire par apoptose.

TSAP 1 est homologue à la phospholipase C bêta 4 de rat. La 5 séquence de TSAP 1 présente 100 % d'identité avec la PLC entre les nucléotides 3967 et 3985 ; 82 % entre les nucléotides 3986 et 4116 et 85 % entre les nucléotides 4070 et 4220 (figure 4). La PLC est connue pour être impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs de la tyrosine-kinase, et pour catalyser l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate en diacylglycérol et inositol-1,4,5-triphosphate. Toutefois, la présente étude 10 suggère que la PLC est une cible en aval dans l'apoptose à médiation p53.

TSAP 2 montre des séquences conservées (92 % d'identité entre les nucléotides 259 et 299 ; 100 % d'identité entre les nucléotides 418 et 458 et 92 % d'identité entre les nucléotides 645 et 685) avec la protéine digitée au zinc 15 (ZFM 1) qui est localisée dans le locus Multiple Endocrine Neoplasia (MEN 1) (figure 5). MEN 1 est un désordre dominant autosomal associé avec le développement de tumeurs affectant le lobe antérieur des glandes pituitaires et parathyroïdes et les cellules des îlots pancréatiques. Il est particulièrement intéressant d'avoir mis en évidence qu'à la fois ZFM et une isoenzyme de PLC 20 sont colocalisés dans la même région chromosomique 11q13 contenant le gène de susceptibilité à MEN 1. Chez la souris, les régions homologues sont localisées sur le chromosome 19B. Le fait de trouver que TSAP 1 et TSAP 2 sont activés en réponse à p53 peut suggérer que ces gènes appartiennent à une voie de suppression des tumeurs plus globale et que p53 peut coopérer avec 25 MEN 1.

TSAP 3 est identique à Siah 1b. Ce gène est l'homologue chez les vertébrés du gène Drosophila seven in absentia (sina). Le clone décrit présente 94 % d'identité avec l'homologue murin (nucléotides 1496 à 1634) (figure 6). Par analyse Northern blot en utilisant une sonde TSAP 3, on a pu 30 détecter une expression différentielle d'un messager de 1,9 kb de ce gène (figure 2A). Ceci est confirmé en utilisant une seconde sonde correspondant à la même région de la séquence siah 1b décrite (figure 2B). La figure 2C montre la distribution tissulaire de ce gène en utilisant une sonde TSAP 3 qui détecte à la fois l'ARNm de 1,9 et de 2,4 kb correspondant aux résultats 35 mentionnés précédemment lorsqu'une sonde siah est utilisée. L'hybridation *in situ* montre que l'ARNm de TSAP 3 est induit rapidement 1 heure après l'induction de l'apoptose (figure 3D). Son expression augmente après 2 et

4 heures (figures 3E et 3F). Dans les cellules qui sont entrées en mitose aucun signal n'est détecté.

Carthew et Rubin ont montré que *seven in absentia* est nécessaire pour le développement de l'œil de la drosophile. D'autre part, des mutants de ce gène dans la drosophile montrent un rôle beaucoup plus général dans le développement. L'homologue murin est subdivisé en deux groupes *siah 1* et *siah 2* et ces protéines montrent un degré de conservation tout à fait inhabituel par rapport à *drosophila seven in absentia*.

Nos résultats ont montré que TSAP 3 / *siah 1b* est activé dans le programme de mort cellulaire dans les cellules M1 induites par le gène suppresseur de tumeur p53. Comme ce gène code pour une protéine digitée au zinc nucléaire, il pourrait être un facteur de transcription régulateur qui est en aval du signal de p53. Les résultats montrent également un lien direct entre les gènes concernant le développement chez la drosophile et une voie majeure de suppression tumorale.

EXAMPLE 2

En utilisant le fragment d'ADNc murin (TSAP 3), décrit ci-dessus, obtenu par analyse différentielle d'ARNm, on a constitué une sonde pour isoler un fragment de 1,1 kb d'une librairie d'ADNc humain qui ensuite a été expansé jusqu'à la région codante entière par une RACE-PCR.

La figure 7 montre l'ADNc et la séquence d'acides aminés du gène humain *sina* (TSAP 3).

Cette séquence code une protéine de 282 amino-acides avec un motif digité au zinc C3HC4. Cette protéine présente également des analogies avec des protéines capables de se fixer sur l'ARN. La séquence en amino-acides est très conservée entre la Drosophile, la souris et le gène humain (figure 7).

La distribution tissulaire indique que le *sina* humain est exprimé de façon ubiquitaire et code pour un ARNm de 2,3 kb et, dans le placenta, il existe un transcript additionnel de 2,5 kb.

En analysant des YAC du CEPII et des librairies BAC par PCR, en utilisant des amorces *sina* humains spécifiques, on a pu isoler 8 YAC (350-1000 kb) et 2 BAC (100 et 125 kb).

La fluorescence par hybridation in situ (FISH) utilisant les clones YAC et BAC montre que le *seven in absentia* est localisé sur le chromosome 16q12-13, c'est-à-dire dans une région contenant les gènes suppresseurs de tumeurs candidat dans différents cancers, notamment : cancer du sein (9),

tumeur de Wilm's (10-12), syndrome de Laurence-Moon-Bardet-Biedl (13), syndrome de Beckwith-Wiederman (14).

Comme cela a été indiqué dans la demande de brevet français N° 95 15 146, on a trouvé que des transfectances stables de cellules M1 murines avec le mutant p53 sensible à la température montraient l'activation de seven in absentia après induction de l'apoptose à 32°C. Etant donné que le TSAP 3 murin a été isolé dans un modèle d'apoptose induit par le gène p53, il était logique d'approfondir l'analyse du gène TSAP3 (HUMSIAH) dans un modèle d'apoptose physiologique humain.

10 Ce modèle est décrit dans l'intestin où les cellules migrent du fond de la crypte vers la région apicale des vilosités où elles meurent par apoptose avant d'être larguées dans le lumen. Ces cellules en apoptose sont spécifiquement marquées par la technique TUNEL.

15 D'autre part, ces mêmes cellules sont positives par hybridation in situ pour le gène TSAP 3 (HUMSIAH) dans l'apoptose physiologique chez l'humain.

Enfin, afin d'investiguer l'implication du gène TSAP 3 humain dans la suppression des tumeurs, on a utilisé un modèle basé sur l'ensemble des gènes plutôt que sur un seul gène. Ce modèle repose sur les propriétés 20 biologiques du parvovirus H-1.

Des recherches très complètes dans ce domaine ont montré sur les 20 dernières années que le parvovirus tue préférentiellement les cellules tumorales alors qu'il épargne leur contrepartie normale.

De façon à élaborer un modèle, on a fait l'hypothèse suivante : s'il 25 était possible de sélectionner, à partir d'une tumeur qui soit sensible à l'effet cytopathique du parvovirus H-1, les cellules qui étaient résistantes, cette résistance pourrait être due à un changement de leur phénotype malin. Ceci a pu être démontré pour les cellules KS sélectionnées à partir des cellules érythro-leucémiques K562 humaines. Tandis que les cellules parentales K562 30 sont sensibles à l'effet cytopathique du parvovirus H-1, les cellules KS, elles, sont résistantes. Ces cellules résistantes réexpriment le type sauvage de p53 et ont un phénotype supprimé à la fois in vitro et in vivo.

Pour confirmer ces observations sur d'autres cellules, on a sélectionné, à partir d'un monoclonal d'une leucémie monocytaire U937 humaine, les cellules filles US3 et US4. Ces clones sont résistants à l'effet cytopathique des parvovirus H-1 et montrent une réversion du phénotype malin in vivo. L'analyse de marqueurs de surface pour 20 cellules, indique

qu'il n'y a pas de déplacement dans le stade de différentiation entre U937 et les clones US indiquant que la suppression du phénotype malin n'est pas due à une différentiation terminale.

Ni les cellules K562 ni les cellules U937 n'expriment p53. Par 5 contrasté aux cellules KS qui réexpriment p53, les cellules US3 et US4 ne réexpriment p53. Toutefois, on a pu mettre en évidence le fait que les cellules US3 et US4 montrent l'activation de WAF-1 par rapport aux cellules parentales malignes U937. Une telle activation de WAF-1 dans une voie indépendante de p53 alternative a été récemment décrite et les résultats 10 actuels montrent que les clones US3 et US4 utilisent, semble-t-il, cette voie alternative WAF-1.

Le gène *sina* est activé par le type sauvage p53 inductible dans les cellules M1 de même que dans les cellules KS qui réexpriment le type sauvage p53.

15 Tandis que les cellules parentales U937 expriment très légèrement l'ARNm de *sina*, il est activé dans les clones filles US3 et US4 qui ont une réversion de leur phénotype malin et qui réexpriment p21waf-1.

De façon intéressante, *sina* est activé dans les cellules qui deviennent apoptotiques, comme cela est montré par un double marquage 20 utilisant une sonde *sina* pour hybridation *in situ* combinée avec un essai TUNEL.

Ceci permet de démontrer que le gène *sina* humain qui est très conservé dans la phylogénie joue un rôle dans l'apoptose et la suppression tumorale.

25 De façon encore plus importante, *sina* se situe au croisement des voies de p53 et de WAF-1.

En outre, en utilisant le modèle de U937 et US3 et US4, on a pu montrer un lien fonctionnel pour les molécules suppresseurs en utilisant un modèle biologique global qui permet la comparaison à des niveaux 30 moléculaires entre les cellules malignes parentales et les cellules filles directement dérivées. Ces expériences indiquent qu'il n'est pas nécessaire de transférer les gènes suppresseurs de tumeur humains spécifiques de façon à leur conférer le phénotype suppresseur, mais que la réversion tumorale est sous le contrôle d'un système de régulation qui est toujours présent dans le 35 matériel génétique des cellules tumorales bien qu'il soit nécessaire de le réactiver.

TABLEAUCARACTERISTIQUES DES CLONES

<u>Clone à expression différentielle</u>	<u>Amorces 3' et 5' *</u>	<u>Taille de l'ARNm en kb</u>	<u>Homologie</u>
TSAP 1	T11GC-16	2,0 et 4,5	PLC #
TSAP 2	T11GC-5	5,9	MEN1 §
TSAP 3 (IDS N° 3)	T11CG-4	1,9	siah 1b ¶
TSAP 4	T11GC-6	5,0	Non
TSAP 5	T11CG-5	1,2	Non
TSAP 6	T11AG-1	2,8	Non
TSAP 7	T11GC-16	> 8,0	Non
TSAP 8	T11GC-6	> 10,0	Non
TSIP 1	T11CG-8	3,0	Non
TSIP 2	T11AA-5	3,1	AD3 *

* Les chiffres et les séquences des amorces en 5' correspondent à ceux rapportés par Bauer et al. (4)

Rat phospholipase C-béta 4 ARNm (RATPHOSCB)

§ ARNm humains (HUMMEN1C; HUMZFM1C; HUMZFM1A; HUMMEN1A)

¶ siah-1B ARNm (MMSIAH1B)

* AD3, transcript S182 ARNm murin (homologue S182 ARNm humain)

(Sherrington et al.).

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 1

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR:

(B) TYPE: nucléotide

5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: TSAP 1

10 (B) EMPLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 1 :

TSAP1

10.

TGATCACGTAC

15

: : : :

ratPLC CTTCTTCTACTTAACAATTGACTATTGAATTCTTGGCCAACCAAAAGTAGCTATGTAC

3970 3980 3990 4000 4010 4020

20

20 30 40 50 60 70

TSAP1 ACACACACACACAGAT

: :

ratPLC ACACACACACACACACACACACACACACA-----CACACACACACACAGAAAT

25

4030 4040 4050 4050

80 90 100 110 120 130

TSAP1 CCCCTATTCTGACAGGCAGAGTTGAATCATGATATATGGCTTAAACATGTTGCCTATGA

: :

ratPLC CCCCTATTCTGACAGGCAGAGTTGAACCATAATCCACAACTTAAACATGTTGCCTAGGC

4070 4080 4090 4100 4110 4120

20

	140	150	160	170	180	190
TSAP 1	CACAGCATCACAAGCCAGTGGGCTTGGTGATAACAACTCTGCCTTGTGGTCATTAGGAC					
	::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::					
5 ratPLC	CACAGCATCACAAGCCAGTGGGCTTGGTGATAACAACTCTGCCTTGTGGTCATTAGGAC					
	4130	4140	4150	4160	4170	4180
					
	200	210	220	230		
10 TSAP1 1	ATTTTGAGCTGCTGCTGCTGCAAA-AAAAATAAGAGCCG					
	:: :: ::::: ::::: :: :::: ::::: :: :::					
ratPLC	ATGTTGAGCTGCTGCTG--GAAAAGGAAAATTAGTGCATTAGTACTTTAATGCCAAGCG					
	4190	4200	4210	4220	4230	4240

15 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 2

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTÉRISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSAP 2
(B) EMPLACEMENT:

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 2 :

TSAP2

10	20	30	40	50	60		
30	TSAP2	GCTTGGAAACCAATCTACAAACAGCGAGGGGAAGCGGCTTAACACTCGAGAGTTCCGTACCC :: :: ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::: ::::::::::::: :::::::::::::					
	humzfmlc.seq	CCCCTGAGCCCATCTACAAATAGCGAGGGGAAGCGGCTTAACACCCGAGAGTTCCGCACCC					
		250	260	270	280	290	300

70 80 90 100 110 120

TSAP2 GCAAAAAAAATCTCTTGTCTTCCTAAGCTTTCCCTGTGCTAGGGAAAGATCAGT

: : : : :

5 humzfm1c.seq GCAAAAAGCTGGAAGAGGAGCGGCACAAACCTCATCACAGAGATGGTGCACTCATCCGG

310 320 330 340 350 360

130 140

10 TSAP2 AAGTCCCTGGTTATAGATTGGTT

humzfm1c.seq ATTTCAAGCCACCTGCAGATTACAACCTCCAGCAACACGTGTGAGTGAT

370 380 390 400 410

15 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 3

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR:

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

20 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: TSAP 3

(B) EMPLACEMENT:

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 3 :

TSAP3

10

30 TSAP3 3

TTTTTTTTTTTC

: : :

mmssiah1b.seq TTGTAAAAATTTCTGAACCTTGTATTTGTTGATTCATTGTATTGTTGACAAATTTT

1450 1460 1470 1480 1490 1500

22

25

30

35

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 4

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - 5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: TSAP 4
 - 10 (B) EMPLACEMENT:
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 4 :

TSAP4

AACTCCGTG	TGGGTGTGGG	GACCTAATTG	CTTATATTTT	TACAAACAAGG	ACTGTACAAA	50
15 CTGTGCCCTT	CCCTAATGCA	CTTATACTAT	TTCCATTAAG	ATCGGTAACC	TTAGTTAAGG	120
CTTTATATTC	ACTGCCATGG	GTAGGAATGC	TCACGGTGAA	TGGGCGCAACT	TGTATGGAA	160
GAAGCCCTCA	TTTCAGTTG	GC	202			

20 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 5

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - 25 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: TSAP 5
 - (B) EMPLACEMENT:
- 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 5 :

TSAPS

	TAAACAAGGAT ATTCAAGGTT CGGATTGGTT TCCTAAGCGA TGATCTCAAC CTCCACGTGG	60
5	AACTGATTTC CCAAGGGACA GAAATGGTCT TTGATCTTTC TGAACCACCT GTCTTCACAC	120
	TCTTTGGAGG ACGCAACCAC CATGGCAGTC AGGGCTCCGG GGCCCACACCA CTTCACCTCC	180
	GAATGAAGCT CCTCTTTTAT CTTTCTGGG ACAATGTCTT CCCCCATAGC CTCCCTCCATC	240
	AACAGCAAAG TACCTTCCCT AAAGTTGAAG TCCTTCACCTT TCCCTCCAAT TTCCCTGCTGA	300
10	GTCCTCAAGT TCTTCTCCAA CGCGAATGAT GTTGCTGAG ACTGGGCAGG CTGAAGCAGG	360
	AGCCTGGCGC GGAGCAAAA GGCGCATGCT TTCCTCCGAG CCTCCATCTG TCCCTCTTCC	420
	CTCCGCCCTTG CCAGGGAAAGG CATATTCTC CTGAGCACTA CCACTCGCTT CCACGGAGAG	480
	CACTGCATTTC TCAGGCAAGG TCGTGGCCAA AGACAAAAGA GAGCCTGTTT CCGACTGTAC	540
15	AGAGGAGGGA CCGACGGCCT TGTCACTTGA CCCAGAACTC TTCTGTCCCT GGGGTGACAC	600
	CCTGCTGGCA GCCCCGGGCC TGGACTCAGG TATGCCCTCTG CCAGCTTACA CCAGCTCCAC	660
	GGCTTGAGCG GGTGCAAAAGC AATCAGCTTG TGCAGGCAGA AGATCGTGTG CTCCCGGCTC	720
	TGCAGGCTGG AAAAGACGGC CAGGTGGAGG TGGAGCACCA CGGTCAGATG GTCTGTGTTG	780
20	GTGGCTTTGC TTTCCAAGTC TGCCGCCATC TCCAGGGCCT CCTCATGCCT CCCAACTGAG	840
	CCAGACACCG AGCCTGGCCT TCTTGGACAT CCCTTTTCAAT CCCAAAATTA GTACATGCTA	900
	ATGTTGGAG ATATGGAGTA TTCTGCAGG GCTTCTCGT ATTCCTGTCTG TCTCTAGGCC	960
	AGGTCCCCCTC TGAATTCTT GAGAGTGAGA ACTTCATAAT CGTCACTACA TTCTGTCTCT	1020
25	TCATAAAAACC ATGGGGCTCG CAGAGCTTGG CGCGGTAGGG GGAGGGCGGC TCGGGGCCGGC	1080
	GCTCCGGCCT CTGCTCGAAC ACCGAGTCCT CAATTCGCC GCCCAGCACC CAGCATCCGG	1140
	TCTCCATCGC CCGGAAGTGC AACTGGACCT CGAAACGAGG CGACACCTAG AGCGACGCC	1200
	ATCAACCCAGC CTCCAAAGGC CGCGACAGCA GCCGGGCCAA GGCTGCCGAG GCAAGGTAGA	1260
30	GACCTGGCCCG GCGGGCCGCT CGAGCCCTAT AGTGAGTCCT ATTAGGATGC	1310

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 6

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- 5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSAP 6

10 (B) EMPLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 6 :

TSAP6

15	CTGAGTACAT ATCACATGTA TGGGGTGTCA TTCTGAGTAT CTCAGTTTAC ACCTGCATCC CAGGAATTAG GATCTCAGCC ACCCACCGAT ATATCATCAC CTGGCTGTGC AGCATCCAGA AAAGAGACCC GAACCCAGCT CAGGGCCCCC ACAAGCCATC TCCACTTCCA GGGCCTCACA CGTGGCTTGT TTTCTCCCCC TGTGTGTGGT CCCCGGACAG CATGAACTTG ACAGCCCCAT	60 120 130 240
20	CTTTCTCCCA GCCCCCTGGGG ATCTTGGTGA GTCTGGGGTT TGAGGGAGGG CAGGAGGAAC AGGCCCCCTGG CCAGGATGAT TCACACAGGG GCAGGGAGCA CCTGAGTGT CGAATGTGG GCGGGCAGGT AGAACTTGT AGTGGTTTTT CCTTCAAAAG GCACGGGTGC AGCCCTAGGT GAGTGTGTGC ATTGTGCTGA GTATCAGGGC CACGAAGCCC AGTGTGGACT GCACGAAGGT	300 360 420 480
25	GAACTCCTTC CAGTTGAGGC AATTAGCAAT GGACGGGAGC GAGGTGACAG CCAGCAGCGA CAACATGCCA AGGGCCAGCA CACCCAGGGA CAGGTATATC TCCATCCTCC AGACTTCTTC CTCAGCCCCAG AGGGGGCTCT TGTTGGCCAG GACCTGCTTC ACAGCCAGAT TGACCAGGTC GTAGGGCGGTG GGACCGGGCC AGCGGCAGGC AGAAGCTGTA GAGAGCCTGC AGCATCGCGA	540 600 650 720
30	AGAAGAAGCT GAGCAGCCCCG ATCTGCTTGC GATGCTGCAG CCAGTGGTGC AGCCAGTCTC GGAAGCGCTG GTACTTGGTC CCCCTCCGCA GCTGAAGCCC AGCTGCCAGC ACACCGGGCA GGTACACTAG GGACAGCAGC ACATAAGCCA CACAGGGTAG TGTGGTGTTC ACCACAGACA	780 840 900
35	AGGGCATCTT GAAAAACTTG TTCTCATCTT TCCGAATGTN TGGCTGTANA ACCTCCCCGA TGAAAATTGTA GGTGTANAAN CACACAAAGA CCCCCAGTGCC CAGGAAGGTG GGGCCCTTCC	950 1020

AGAATGGAAG	GAAGCNCAGG	GGTTTNGCTT	CTACCTCCCT	CNCTGAAGGC	CANGGATCCA	1080
TNTCCAGGGG	TTNAAAACCAT	NGGGCGTGCA	TCTCTGAAAA	TGGTCNCTTC	GNTTCTGGTK	1140
GATCANTGCCA	AATAACNCCT	GCCTGTTCCN	TCCCTTGGGG	CCACCCCTNTN	GGGGCCATCC	1200

5 CAA 1203

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 7

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- 10 (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

15 (A) NOM/CLE: TSAP 7

(B) EMPLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 7 :

TSAP7

20	GCCCATTCCAG	TCATTCCTTA	TTTCAGTGTG	TGAAAGCCCTC	CTACGGATTT	TCCCCCAAT	60
	TAATTTTAA	TCCATTTCA	AACCAGCCTT	TACTGTGGCC	TTTTCTGCTA	TTTTTGATAT	
	ATCTTACAC	GTGTGCATAG					120

25 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 8

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 30 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: TSAP 8

(B) EMPLACEMENT:

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 8 :

TSAP8

CACGTAAAG TACCACATCC NCCCCATTG CTAGATATTG ANAGAGTATA TANATAGGNC	60
GAAGCACART CTCTTCCCTT CCTNTGTACA CCTCANACCC AGTGACTTCC NACCNAAGCN	120
5 CNTGANTGTN TTTGTNGATA TGAGTGTCTG NGTGTGTGNA TNTGCCGTCTC ACATGTATCC	130
GACGACCNAC CCCACCCCCA CGGGCCTTCA NGCACAAATNG AGGACCCCTA TNGTGGATAC	240
GNGCATCGGT AANAGC 257	

INFORMATIONS POUR LA SEO ID N° : 9

- 10 (i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

 - (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTÉRIQUE:

 - (A) NOM/CLE: TSIP 1
 - (B) EMPLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SÉQUENCE: SEQ ID
20 TSIP1

GGAGCCCCGTC TAGCTTTCTC TTTACTTATC ACTCTGAGGT CCTCAGGTCA CAGAGAAAGGC 63
ACTTAATTGG GAAAGGTCACTC TGATTCGGGC CATCTTCTCTC CCTCTTACCA A 111

25 INFORMATIONS POUR LA SEO ID N° : 10

- 30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

 - (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

 - (A) NOM/CLE: TSIP 2
 - (B) EMPLACEMENT:

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID

TSIP2

	CACCGGTGAGACCTCTAGGCCGGGCCCTAGGACGACCTGCTCCGTGGCCGCGAGTATT	60
	GTCGGAAACAAAACAGCGGCAGCTGAGGCGGAACCTAGGCTGCGAGCCGGCCCGGG	120
5	CGCGGAGAGAGAAGGAACCAACACAAGACAGCAGCCCTCGAGGTCTTAGGCAGCTTGG	180
	AGGAGAACACATGAGAGAAAAGAATCCCAAGAGAGTTTGTCTTGAGAAGGTATTTCT	240
	GTCCAGCTGCTCCAATGACAGAGATACTGCACCTTGTCCACTTCCAGAATGCCAGA	300
	TGTCTGAGGACAGCCACTCCAGCAGGCCATCCGGAGCCAGAATGACAGCCAGAACGGC	360
10	AGCAGCAGCATGACAGGCAGAGACTTGACAACCTGAGCCAATATCTAATGGCCGGCCCC	420
	AGAGTAACTCAAGACAGGTGGTGGAACAAAGATGAGGAGGAAGACGAAGAGACTGACATTGA	480
	AATATGGAGCCAAGCAGTCATGTCATCATGCTCTTGCCCCGTGACCCCTCGCATGGTCGTG	540
	TCGTGCCACCACATCAAATCAGTCAGCTTCTATAACCCGGAAGGACGGTCAGCTAATCTACA	600
	CCCCATTACAGAACAGACACTGAGACTGTAGGCCAAAGAGCCCTGCACTCGATCCTGAATG	660
15	CGGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTCATTATGACCATCCTCTGGTGGTCCGTATAAAT	720
	ACAGGTGCTACAAGGTCACTCACGCCCTGGCTTATTATTCATCTCTGTTGTTGCTGTTCT	780
	TTTTTCGTTCATTTACTTAGGGGAAGTATTTAAGACCTACAATGTCGCCGTGGACTACG	840
	TTACAGTAGCACTCCTAATCTGGATTTTGGTGTGGTCGGGATGATTGCCATCCACTGGAA	900
20	AAGGCCCTTCGACTGCAGCAGGCATCTCATTATGATCAGTGCCTCATGGCCCTGG	960
	TATTTATCAAGTACCTCCCCAATGGACCGCATGGCTCATCTGGCTGTGATTCACTGAT	1020
	ATGATTGGTGGCTGTTTATGTCCTAACAGGCCACTTCGTATGCTGTTGAAACAGCTC	1080
	ACGGAAAGAAATGAGACTCTCTTCCAGCTCTTATCTATTCCCTAACAAATGGTGTGGTTGG	1140
	TGAATATGGCTGAAGGAGACCCAGAACGCCAAAGGAGGGTACCCAGAACACCCAAAGTATA	1200
25	ACACACAAAGAGCGGAGAGAGAGACACAGGACAGTGGTCTGGAACGATGATGGTGGCT	1260
	TCACTGAGGAGTGGGAGGCCAAAGAGACAGTCACCTGGGCCTCATCGCTCCACTCCG	1320
	AGTCAGAGCTGCTCCAGGAACCTCTGGGAGCATTCTAACGAGTGAAGACCCGGAGG	1380
	AAAGAGGAGTAAACTGGACTGGAGATTTCATTTCTACAGTGTCTGGTTGAAAG	1440
30	CCTCAGCAACGCCAGTGGAGACTGGAACACAAACCATAGCCTGTTGTACCCATACTGA	1500
	TCGGCCTGTGCCCTACATTACTCCTGCTGCCATTTCAGAAGCCTGCCAGCCCTCC	1560
	CCATCTCCATCACCTCGGCCCTGTTCTACTTCGCCACGGATTACCTGTGCAGCCCT	1620
	TCATGGACCAACTGCATTCCATCAGTTTATATCTAGCCTTCTGCAGTTAGAACATGG	1680
	ATGTTTCTCTTGTATTATCAAAACACAAAAACAGAGAGCAAGCCCGAGGGAGGAGACTG	1740
35	GTGACTTTCTGTGTCCCTAGCTAACAAAGCAGGACTCCAGCTGGACTTCTGCAGCTTC	1800
	CTTCCGAGTCTCCCTAGCCACCCGCACTACTGGACTGTGGAAAGCGTCTACAGAGGA	1860

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 11

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNC

(ix) CARACTÉRISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSAP 3 humain

10 (B) EMPLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 11 :

TSAP3 humain

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Liang P. & Pardee A.B. (1992) Science, 257, 967-971.
- (2) Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K. & Mattick J.S. (1991) Nucl. Acids Res., 19, 4008.
- (3) Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A. & Oren M. (1991) Nature 352, 345-347.
- (4) Bauer D., Muller H., Reich J., Riedel H., Ahrenkiel V., Warthoe P. & Strauss M. (1993) Nucl. Acids Res. 21, 4272-4280.
- (5) Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual.
- (6) Okamoto K. & Beach D. (1994) EMBO J., 13, 4816-4822.
- (7) Angerer L. & Angerer R.C. (1991) Methods in cell biology : functional organization of the nucleus, 35, 37-71.
- (8) Linares-Cruz G., Rigaut J.P., Vassy J., De Oliveira T.C., De Cremoux P., Olofsson B. & Calvo F. (1994) J. Microsc., 173, 27-38.
- (9) Bieche I. and Lidereau R., Genes Chromosomes and Cancer 14, 227-251 (1995).
- (10) Wang-Wuu S., Soukup S., Bove K., Gotwals B. and Lampkin B., Cancer Research 50, 2786-2793 (1990).
- (11) Maw M.A. et al., Cancer Research 52, 3094-3098 (1992).
- (12) Austruy E. et al., Genes, Chromosomes and Cancer, 14, 285-294 (1995).
- (13) Kuytek-Black A.E. et al., Nat. Genet 5(4)n 392-396 (1993).
- (14) Newsham I. et al., Genes Chromosomes and Cancer 12(1), 1-7. (1995).
- (15) Sherrington et al., Nature, vol. 375, p. 754-760 (1995).

REVENDICATIONS

- 1) Séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :
 - (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 4 à 11 ou
 - 5 (b) un gène équivalent qui comporte :
 - (c) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
 - (d) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou
 - (e) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente.
- 10 2) Séquence selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'expression cellulaire du gène est induite lors de l'apoptose cellulaire.
- 3) Séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :
 - (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 1 et 3 ou
 - 15 (b) un gène équivalent qui comporte :
 - (c) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
 - (d) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou
 - (e) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,
- 20 caractérisée en ce que l'expression cellulaire du gène est induite par la suppression tumorale.
- 4) Séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :
 - (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 2 ou
 - 25 (b) un gène équivalent qui comporte :
 - (c) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
 - (d) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou
 - (e) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,
- 30 caractérisée en ce que l'expression cellulaire du gène est induite par l'apoptose cellulaire.
- 5) Séquence selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'expression cellulaire du gène est induite par p53.
- 35 6) Séquence selon la revendication 2 ou 4, caractérisée en ce que l'apoptose cellulaire est induite par p53.

- 7) Séquence selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain ou un gène équivalent.
- 8) Séquence selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'expression cellulaire du gène est inhibée lors de l'apoptose cellulaire.
- 5 9) Séquence selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'apoptose cellulaire est induite par p53.
- 10 10) Séquence selon l'une des revendications 1 et 8 et 9, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi TSIP 1 et TSIP 2 ou un gène équivalent.
- 11) Vecteur d'expression cellulaire d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 10.
- 12) Vecteur d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.
- 15 13) Vecteur selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus herpès ou d'un poxvirus.
- 14) Vecteur selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur à acide nucléique nu.
- 20 15) Vecteur selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence assurant le ciblage et/ou l'expression spécifique des tissus ou organes.
- 16) Cellule transformée par un vecteur d'expression selon l'une des revendications 11 à 15.
- 25 17) Protéine pouvant être obtenue par culture de cellule transformée selon la revendication 16 et codée par la séquence selon l'une des revendications 1 à 10.
- 18) A titre de médicament, un vecteur selon l'une des revendications 11 à 15 ou une protéine selon la revendication 17.
- 30 19) A titre de médicament, un composé assurant l'expression cellulaire d'au moins une des séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 7 ou de leurs produits.
- 20) A titre de médicament selon la revendication 19, un vecteur nucléotidique assurant l'expression cellulaire de ladite séquence.
- 35 21) A titre de médicament, un composé assurant l'inhibition de l'expression cellulaire d'au moins un gène cellulaire selon l'une des revendications 1, 8 à 10 ou de leurs produits.

22) A titre de médicament selon la revendication 21, un nucléotide activé assurant le blocage de la séquence nucléotidique.

23) A titre de médicament selon la revendication 21, un anticorps monoclonal dressé contre la ou les protéines codées par la séquence nucléotidique.
5

24) A titre de médicament destiné au traitement du cancer, un médicament selon l'une des revendications 18 à 23.

25) A titre de médicament destiné au traitement de la maladie d'Alzheimer, un médicament selon l'une des revendications 18 à 23.

10 26) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi des cancers, tout ou partie des séquences selon l'une des revendications 1 à 10 à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification.

15 27) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi des cancers un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par la séquence selon l'une des revendications 1 à 10 ou les anticorps correspondants.

20 28) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi de la maladie d'Alzheimer, tout ou partie des séquences selon l'une des revendications 1, 5, 7 à 10 à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification.

25 29) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi de la maladie d'Alzheimer un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par la séquence selon l'une des revendications 1, 5, 7 à 10 ou les anticorps correspondants.

30) A titre d'agent antiviral, un médicament selon la revendication 20.

31) Modèle pour la mise en évidence de médicament anti-cancéreux, des cellules selon la revendication 16.

30 32) A titre de perfectionnement de la méthode de Liang et Pardue le fait d'utiliser une diminution en palier lors de l'amplification PCR.

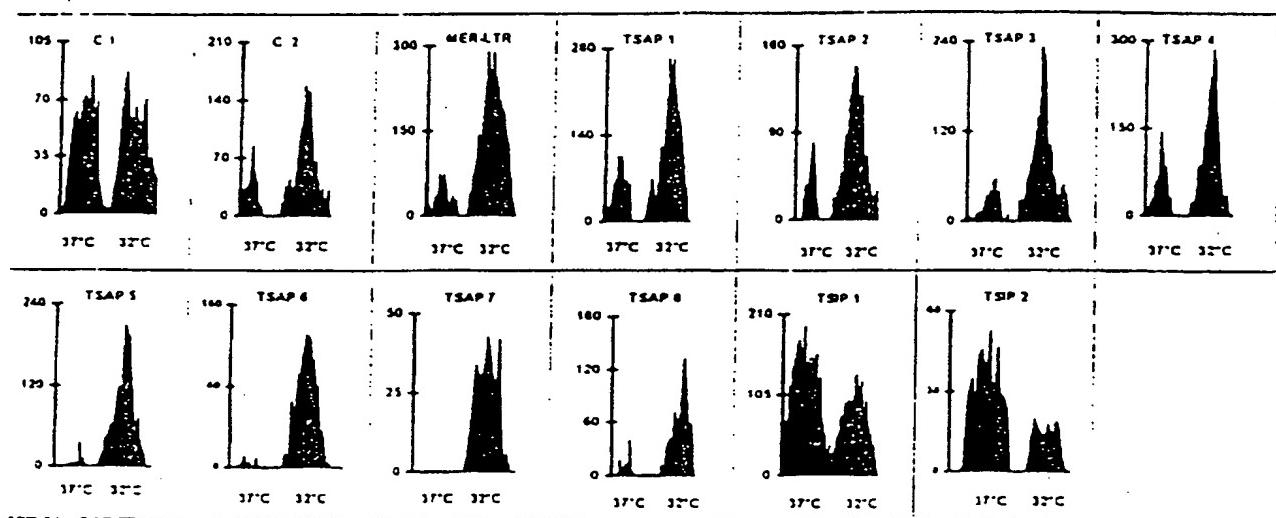


FIG. 1

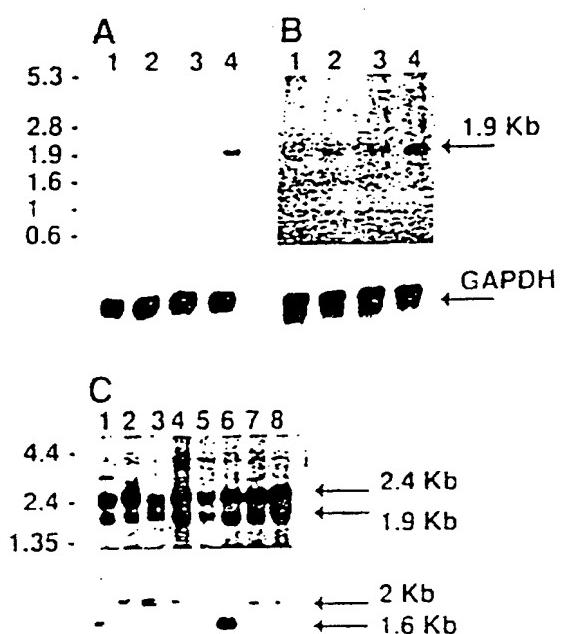


FIG. 2

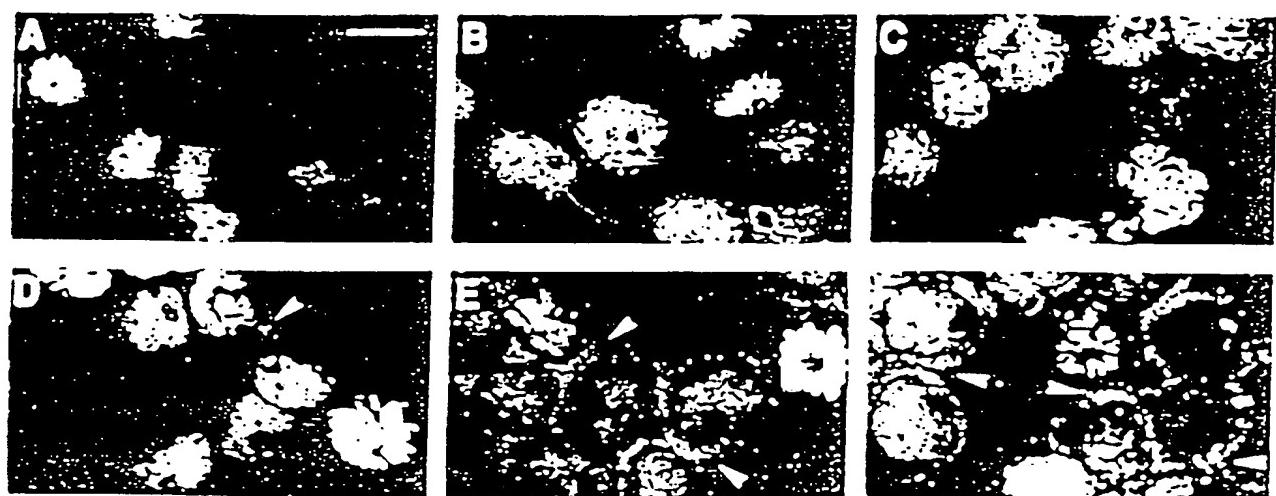


FIG. 3

4/16

TSAP1

10. TGATCACGTAC
 : : : : :

ratPLC CTTCTTCTACTTAACAATTTGACTATTGAATTCTTGCCAAACCAAAAGTACCTATGTAC
 3970 3980 3990 4000 4010 4020

20 30 40 50 60 70

TSAP1 ACACACACACACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAT
 :

ratPLC ACACACACACACACACACACACACACACA-----CACACACACACACACAGAAAT
 4030 4040 4050 4060

60 90 100 110 120 130

TSAP1 CCCCTATTCTGACAGGCAGAGTTGAATCATGATATATGGCTTAAACATGTTGCTATGA
 :

ratPLC CCCCTATTCTGACAGGCAGAGTTGAACCATAATCCACAACTTAAACATGTTGCTAGGG
 4070 4080 4090 4100 4110 4120

140 150 150 170 180 190

TSAP1 GACAGGCATCACAAAGCCAGTGGGCTTGGTATAACAACTCTGCTTGTGCTGCATTAGGAC
 :

ratPLC GACAGGCATCACAAAGCCAGTGGGCTTGGTATAACAACTCTGCTTGTGCTGCATTAGGAC
 4130 4140 4150 4160 4170 4180

200 210 220 230

TSAP1 ATTTTTGAGCTGCTGCTGCTGCAA-AAAAATAAGAGCCC
 :

ratPLC ATGTTCGAGCTGCTGCTG--GAAAAAGGAAATTAGTCATTACTACTTTAATGCCAAGCG
 4190 4200 4210 4220 4230 4240

5/16

TSAP2

10 20 30 40 50 60
TSAP2 CCTTGGAACCAATCTACAAACAGCGAGGGGAGCCGCTTAACACTCGAGAGTTCCGTACCC

 :: :: ::::::: ::::::::::::::::::::: ::::::: :::::
humzfmlc.seq CCCCTGAGCCCATCTACAATAGCGAGGGGAGCCGCTTAACACCCGAGAGTTCCGCACCC

250 260 270 280 290 300

70 80 90 100 110 120
TSAP2 GCAAAAAAAAATCTCTTGTTTCCCTAAGCTTTCCCTGTGCTAGGGAAAGATCAGT

:::::::

humzfmlc.seq GCAAAAGCTGGAAGAGGAGCCGACAAACCTCATCACAGAGATGGTCCACTCAATCCGG

310 320 330 340 350 360

130 140

TSAP2 AAGTCCTGCTTATACATTGGTT

humzfmlc.seq ATTTCAAGCCACCTGCAGATTACAACCTCCAGCAACACGTGTGACTGAT

370 380 390 400 410

FIG. 5

6/16

TSAP3

10

TSAP3 3

::::::::::TTTTTTTTTTG

:::

mmsiah1b.seq TTGTAAAAATATTCTGAACCTTGTATTCGGTAGATTGATTGATTGTTGACAATT

1450 1460 1470 1480 1490 1500

20 30 40 50 60 70

TSAP 3 CGGGGTGGGGGTGTGCCTGCACACATGCCGTGCACGTGTGTGCCTGGTTCTTTAACAA

::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::

mmsiah1b.seq CGGGGTGGGGGTGTGCCTGCACACATGCCGTGCACGTGTGTGCCTGGTTCTTTAACAA

1510 1520 1530 1540 1550 1560

80 90 100 110 120 130

TSAP 3 GCCATCTACGTGTCAAGCCCACCTGTTTCCCTTGACTCAACACATACTGCTGCTGT

::: ::::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::

mmsiah1b.seq GCCATCTACGTGTCAAGCCCACCTGTTTCCCTTGACTCAACACATACTGCTGCTGT

1570 1580 1590 1600 1610 1620

140

TSAP3 GGTTTGGGTTGGT

::: :::::::

mmsiah1b.seq GGTTTGGGTTGGTGTGTTGGTTGGATGTGTGTATTGATAATTATTATTCTA

1630 1640 1650 1660 1670 1680

HUMSIAH MMIAH1A_1 MMIAH1B_1 DROSINA_1	-----MSRQTATALPTGTSKC?PSQRVPALTGTTASNN----- -----MSRQTATALPTGTSKC?PSQRVPALTGTTASNN----- -----MSRQAATALSTGTSKC?PSQRVPALTDTTASNN----- MSNKINPKRREPTAALLAGAGATGVATNTSTGSSAGNTSSANTSSSSSSSLSSAGGGD *****
HUMSIAH MMIAH1A_1 MMIAH1B_1 DROSINA_1	-----DLASLFECPVCFDYVLPPILQCQSGHLVCSNCRPKLTCCPTCRGPPLGSIRNLAME -----DLASLFECPVCFDYVLPPILQCQSGHLVCSNCRPKLTCCPTCRGPPLGSIRNLAME -----DLASLFECPVCFDYVLPPILQCQSGHLVCSNCRPKLTCCPTCRGPPLGSIRNLAME AGMSADLTSLFECPVCFDYVLPPILQCSSGHUVCVSCRSLTCCPTCRGPPLANIRNLAME *****
HUMSIAH MMIAH1A_1 MMIAH1B_1 DROSINA_1	KVANSVLPCKYASSGCEITLPHTERADHEELCEFRPYSCPCPGASCKWQGSLDAVMPHL KVANSVLPCKYASSGCEITLPHTERAEHEELCEFRPYSCPCPGASCKWQGSLDAVMPHL KVANSVLPCKYSASGCEITLPHTKRAEHEELCEFRPYSCPCPGASCKWQGSLDAVMPHL KVASNVKFPCKHSGYGC TASLVYTEKTEHEETCECRPYLCPCPGASCKWQGP LDLVNQHL *****
HUMSIAH MMIAH1A_1 MMIAH1B_1 DROSINA_1	MHQHKSIITLQGEDIVFLATDINLPGAVDWVRC!QSCFGFHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI MHQHKSIITLQGEDIVFLATDINLPGAVDWVRC!QSCFGFHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI MHQHKSIITLQGEDIVFLATDINLPGAVDWVRC!QSCFGFHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI MMSHKSIITLQGEDIVFLATDINLPGAVDWVRC!QSCFGFHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI *****
HUMSIAH MMIAH1A_1 MMIAH1B_1 DROSINA_1	VQLIGTRKQAENFAVRLELNGHRRRLTWEATPRSIHEGIATAIMNSDCLVFDTSEAQLFA VQLIGTRKQAENFAVRLELNGHRRRLTWEATPRSIHEGIATAIMNSDCLVFDTSEAQLFA VQLIGTRKQAENFAVRLELNGHRRRLTWEATPRSIHEGIATAIMNSDCLVFDTSEAQLFA VQLIGSRKEAENFVYRLELNGNRRRLTWEAMPRSIHEGVASAIHNSDCLVFDTSEAQLFA *****
HUMSIAH MMIAH1A_1 MMIAH1B_1 DROSINA_1	ENGNLGINVTISM C ENGNLGINVTISM C ENGNLGINVTISM C DNGNLGINVTISLV *****

FIG. 7

	10	20	30
1 mms182 3 2 tsip2	----- ----- CACCGGTGAC ACCTCTAGGG CGGGGCCCTAG	40 50 60	
1 mms182 3 2 tsip2	----- ----- GACGACCTGC TCCGTGGGCC GCGAGTATTTC	70 80 90	
1 mms182 3 2 tsip2	-----acc anacancggc agctgaggcg ----- GTCGGAAACA AAACAGCGGC AGCTGAGGCG	100 110 120	
1 mms182 3 2 tsip2	gaaacctagg ctgcgcagccg gcccgcgggg ----- GAAACCTAGG CTGCCGAGCCG CCCGGCCCCGGG	130 140 150	
1 mms182 3 2 tsip2	cgcggagaga gaaggAACCA acacaagaca ----- CGCCCGAGAGA GAAGGAACCA ACACAAGACA	160 170 180	
1 mms182 3 2 tsip2	gcagccccttc gaggttttttta ggtagcttgg ----- GCAGCCCTTC GAGGTCTTTA GGCAAGCTTGG	190 200 210	
1 mms182 3 2 tsip2	aggagaacac atgagagaaa gaatcccaag ----- AGGAGAACAC ATGAGAGAAA GAATCCCAAG	220 230 240	
1 mms182 3 2 tsip2	aggttttgtt ttcgtttgaga aggtatttt ----- AGGTTTTGTT TTCTTTGAGA AGGTATTTC	250 260 270	
1 mms182 3 2 tsip2	gtccaggtgc tccaatgaca gagatacccg ----- GTCCAGCTGC TCCAATGACA GAGATAACCTC	280 290 300	
1 mms182 3 2 tsip2	cacctttgtc ttactttccag aacgcccaga ----- CACCTTTGTC CTACTTCCAG AATGCCAGA	310 320 330	
1 mms182 3 2 tsip2	tgtttttggaa cagccactcc agcagcgcca ----- TGTCTGAGGA CAGCCACTCC AGCAGCGCCA		

FIG. 8

		340	350	360
1 mms182	tccggagcca gaatgcacgc caageacggc			
2 tsip2	TCCGGAGCCA GAATGACAGC CAAGAACGGC			
		370	380	390
1 mms182	agcagcaacca tgacaggcag agacttgaca			
2 tsip2	AGCAGCAGCA TGACAGGCAG AGACTTGACA			
		400	410	420
1 mms182	accctgagcc aatatctaattt gggcgcccccc			
2 tsip2	ACCCTGAGCC AATATCTAATT GGGCGGGCCCC			
		430	440	450
1 mms182	agagtaacctt aagacagggtg gtggaaacaag			
2 tsip2	AGAGTAACTC AAGACAGGTG GTGGAAACAAG			
		460	470	480
1 mms182	atgaggaggaa agacgaagag ctgacattga			
2 tsip2	ATGAGGAGGA AGACGAAGAG CTGACATTGA			
		490	500	510
1 mms182	aatacggagc caagcatgtc atcatgcctt			
2 tsip2	AATATGGAGC CAAGCATGTC ATCATGCTCT			
		520	530	540
1 mms182	ttgtcccccgat gacccttcgc atggtcgtcg			
2 tsip2	TTGTCCCCGT GACCCCTCTGC ATGGTCGTGC			
		550	560	570
1 mms182	tcgtggccac catcaaatca gtcagccctt			
2 tsip2	TCGTGGCCAC CATCAAATCA GTCAGCTCT			
		580	590	600
1 mms182	ataccggaa ggacgggtcag ctaatctaca			
2 tsip2	ATACCCGGAA GGACGGTCAG CTAATCTACA			
		610	620	630
1 mms182	ccccattcac ageagacact gagactgttag			
2 tsip2	CCCCATTCAC AGAAGACACT GAGACTGTAG			
		640	650	660
1 mms182	gccaaagaggc cctgcaccccg atccctgactg			
2 tsip2	GCCAAAGAGC CCTGCACTCG ATCCTGAATG			

FIG. 8 (suite)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

		670	680	690
1 mms182		cggccatcat	gaccagggttc	attgtcatta
2 tsip2		CGGCCATCAT	GATCAGTGTC	ATTGTCAATTA
		700	710	720
1 mms182		tgaccatccc	ccttgggggtc	ctgtataaat
2 tsip2		TGACCACCT	CCTGGTGGTC	CTGTATAAAAT
		730	740	750
1 mms182		acagggtgcia	caayygtcaac	caagccctggc
2 tsip2		ACAGGTGCTA	CAAGGTCAATC	CACGCCCTGGC
		760	770	780
1 mms182		tttattatccc	atccccgttg	tttgtgtttcc
2 tsip2		TTATTATTTTC	ATCTCTGTTG	TTGCTGTTCT
		790	800	810
1 mms182		ttttttcggt	catttactta	ggggaaagtat
2 tsip2		TTTTTTCGTT	CATTTACTTA	GGGGAAAGTAT
		820	830	840
1 mms182		ttaagaccta	caatgtcgcc	gtggactacg
2 tsip2		TTAAGACCTA	CAATGTCGCC	GTGGACTACG
		850	860	870
1 mms182		ttacagttgc	actccataatc	ttggaaattttg
2 tsip2		TTACACTAGC	ACTCCTAATC	TGGAATTTC
		880	890	900
1 mms182		gttgtggatgg	gttgtttttcc	atccacttgg
2 tsip2		GTGTGGTCGG	GATGATTGCC	ATCCACTGGA
		910	920	930
1 mms182		aaggcccccc	tcgactgtcag	caggcgatcc
2 tsip2		AAGGCCCCCT	TCGACTGCAG	CAGCCGTATC
		940	950	960
1 mms182		tcattatgtat	caatggcccttc	atggcccttgg
2 tsip2		TCATTATGAT	CAGTCCCCTTC	ATGGCCCTGG
		970	980	990
1 mms182		tatccatcaa	gtacccccc	gaatggaccc
2 tsip2		TATTTATCAA	GTACCTCCCC	GAATGGACCC
		:		

FIG. 8 (suite)

		1000	1010	1020
1 mms132		catggctctat	tttggccat	tttttcgtat
2 tsip2		CATGGCTCAT	CTTGGCTGTC	ATTTCACTAT
		1030	1040	1050
1 mms132		atgatttggc	ggcggtttta	tgcuccaaag
2 tsip2		ATGATTTGGT	GGCTGTTTA	TGTCCCCAAAG
		1060	1070	1080
1 mms132		gcccaacttcg	tatggcggtt	gaaacagatcc
2 tsip2		GCCCACATTG	TATGCTGGT	TCAAACAGCTC
		1090	1100	1110
1 mms132		aggaaaagaaa	cgagactccc	cccccaagccc
2 tsip2		AGGARAGAAA	TGAGACTCTC	TTTCCAGCTC
		1120	1130	1140
1 mms132		ttatccatcc	ctcaacaatc	gttgtttgg
2 tsip2		TTATCTATTC	CTCAACAAATG	CTGTGGTTGG
		1150	1160	1170
1 mms132		tgaatatggc	tgaaggagac	ccagaagccc
2 tsip2		TGAATATGGC	TGAAGGAGAC	CCAGAAGCCC
		1180	1190	1200
1 mms132		aaaggayggc	accbaagaac	cccaagtata
2 tsip2		AAAGGAGGCT	ACCCAAGAAC	CCCAAGTATA
		1210	1220	1230
1 mms132		acacacaaag	agccggagaga	gagacccagg
2 tsip2		ACACACAAAG	AUCGGAGAGA	GAGACACAGG
		1240	1250	1260
1 mms132		acagtggttc	tgggaacgt	gttgtggcc
2 tsip2		ACAGTGCTTC	TGCCAACCGT	GTGCTGGCT
		1270	1280	1290
1 mms132		tcagtgaggg	gtgggaggcc	caaagagaca
2 tsip2		TCAGTGAGGA	GTGGGAGGCC	CAAAGAGACA
		1300	1310	1320
1 mms132		gtcacccggg	gcctcatcgc	ccacccccgg
2 tsip2		GTCACCTGGG	GCCTCATCGG	TCCACTCCCC

FIG. 8 (suite)

		1330	1340	1350
1 mms182		agtc	aaag	gac
2 tsip2		caag	tgctgtcc	tttctg
		-----	-----	-----
1 mms182		AGTC	AAGAGC	TGCTGTCCAG
2 tsip2		CAAG	CATTCT	GAAC
		-----	-----	-----
1 mms182		ggag	cattct	aac
2 tsip2		gcatt	tttt	tttt
		-----	-----	-----
1 mms182		gg	tttt	tttt
2 tsip2		GGAG	CATTCT	AAC
		-----	-----	-----
1 mms182		gg	tttt	tttt
2 tsip2		GGAG	CATTCT	AAC
		-----	-----	-----
1 mms182		aa	aggagg	gt
2 tsip2		AA	AGGAGT	AAA
		-----	-----	-----
1 mms182		aa	aggagg	gt
2 tsip2		AA	AGGAGT	AAA
		-----	-----	-----
1 mms182		tc	at	tttcta
2 tsip2		TC	AT	TTTCTA
		-----	-----	-----
1 mms182		tc	at	tta
2 tsip2		TC	AT	TTCT
		-----	-----	-----
1 mms182		tc	cc	cc
2 tsip2		TC	CT	AGCAAC
		-----	-----	-----
1 mms182		ca	accat	atgc
2 tsip2		CA	ACCATA	TGCA
		-----	-----	-----
1 mms182		ca	accat	tttgt
2 tsip2		CA	ACCATA	CTGCT
		-----	-----	-----
1 mms182		ca	ggcc	ctgt
2 tsip2		CA	GGCC	TGTG
		-----	-----	-----
1 mms182		cc	at	tttcaa
2 tsip2		CC	AT	TTTC
		-----	-----	-----
1 mms182		cc	at	tttcaa
2 tsip2		CC	AT	TTTC
		-----	-----	-----
1 mms182		cc	at	tttccat
2 tsip2		CC	AT	CTCCAT
		-----	-----	-----
1 mms182		cc	at	tttccat
2 tsip2		CC	AT	CTCCAT
		-----	-----	-----
1 mms182		actt	cgccac	ggat
2 tsip2		ACTT	CGCCAC	GGATT
		-----	-----	-----
1 mms182		actt	cgccac	tttgc
2 tsip2		ACTT	CGCCAC	TTGCAG
		-----	-----	-----
1 mms182		tc	atgg	gacca
2 tsip2		TC	ATGG	GACCA
		-----	-----	-----

FIG. 8 (suite)

		1650	1670	1680
1 mms182		atccccatgc cccctgcacgt tagaaacatgg		
2 tsip2		ATATCTAGCC TTTCTGCAGT TAGAACATGG		
		1690	1700	1710
1 mms182		atgttttttc cttgatccc aaaaacccaa		
2 tsip2		ATGTTTCTTC TTGTGATTATC AAAAACACAA		
		1720	1730	1740
1 mms182		aaacagagag caagccccgag gaggagactg		
2 tsip2		AAACAGAGAG CAAGCCCCGAG GAGGAGACTG		
		1750	1760	1770
1 mms182		gtgactttcc tttgtcccccga gctaaccaaag		
2 tsip2		GTGACTTTCC TGTGTCTCA GCTAACAAAG		
		1780	1790	1800
1 mms182		gcaggactcc acgttggactt ctgcagcc		
2 tsip2		GCAGGACTCC AGCTGGACTT CTGCAGCTTC		
		1810	1820	1830
1 mms182		cetcccgatcc ccccttagcca cccgcactac		
2 tsip2		CTTCCCGAGTC TCCCTAGCCA CCCCACACTAC		
		1840	1850	1860
1 mms182		tggacttgtgg aaggaaagctt ctacagagga		
2 tsip2		TCGACTGTGG AAGGAAGCGT CTACAGAGGA		
		1870	1880	1890
1 mms182		acggttttccaa acatccatcg ctgcagcaga		
2 tsip2		ACGGTTTCCA ACATCCATCG CTGCAGCAGA		
		1900	1910	1920
1 mms182		cgggtgtcccc cagtgcacttg agagacaagg		
2 tsip2		CGGTGTCCCT CAGTGACTTG AGAGACAAGG		
		1930	1940	1950
1 mms182		acaaggaaat gggtgtggcc aaggagctgc		
2 tsip2		ACAAGGAAAT GTGCTGGCCC AAGGAGCTGC		
		1960	1970	1980
1 mms182		cgtgtcttcgc tagcttttgac ctggggcatg		
2 tsip2		CGTGCTCTGC TAGCTTTGAC CGTGGGCCATG		

FIG. 8 (suite)

		1990	2000	2010
1 mms182		gagatttacce	cgcactgtga	acccttcataag
2 tsip2		GAGATTTACCC	CGCACTGTGA	ACTCTCTAAG
		2020	2030	2040
1 mms182		gtaaaacaaag	tggggcgaaac	c
2 tsip2		GTAAACAAAG	TGAGCTGAAC	CAAACAGAGC
		2050	2060	2070
1 mms182		<==		
2 tsip2		TGCCATYCTT	CCACACCATG	TTGGAAATAAA
		2080	2090	2100
1 mms182		<==		
2 tsip2		AACCGTCCTA	GCTGGAACCC	TTACTGTCCC
		2110	2120	2130
1 mms182		<==		
2 tsip2		AGGAGGTTCC	GTGTGGGGGT	GGCACTGGGC
		2140	2150	2160
1 mms182		<==		
2 tsip2		CGGGCCTCCC	TCTCAGGCTC	CTTGCTGCC
		2170	2180	2190
1 mms182		<==		
2 tsip2		CACTTGTAAG	TTTAAATAAG	GACACCGCCC
		2200	2210	2220
1 mms182		<==		
2 tsip2		TACACAAACC	TCACCCCTGT	CACATCCACT
		2230	2240	2250
1 mms182		<==		
2 tsip2		GACTCTGACC	ACTTTAGTTC	TCAAACCTCTC
		2260	2270	2280
1 mms182		<==		
2 tsip2		TCACTATTAT	CTGTGGTTCC	CGTTTCTTCC
		2290	2300	2310
1 mms182		<==		
2 tsip2		CAAGGCCAGC	CTGGACCAAT	TTGGGGCTTCC

FIG. 8 (suite)

		2320	2330	2340
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	TCTATCCTGA GAGTTGTAAC CTCAACTTCC	2350	2360
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	AAAGTTTATA TTTCTTGAA ATGATGGATC	2380	2390
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	TATTGCTCAA CAGTCCCTGT CATCCTTAAG	2410	2420
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	TGACTTCTGG GTTTCCCACA AATTCTTCAC	2440	2450
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	TTTTAGACAC ACTCTAAGCT TACTTCTGGC	2470	2480
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	CTGGATGCTT CCTCTCCCTG TCTCTCCCTT	2500	2510
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	GCCCCACAGC GGTTCCCTGA CAGCAGACAA	2530	2540
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	GGCAGCTCTG GGAGGTAGCT AGTATCCAAT	2560	2570
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	AACCCAGGGG TTTCCTCATG TGATGCAAAT	2590	2600
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	ACTACGTGTC CAACCAATCA GTGCTGTCAA	2620	2630
1 mms182	<==			
2 tsip2	<==	CGGGCTGCCA TAGCTCCTTC GATGGCAAAT	2640	

FIG. 8 (suite)

16/16

		2550	2660	2670
1 mms182	<==			
3	<==			
2 tsip2	AGGATGTGTG CCCAAAGAAT TAAAGCGATC	2630	2690	2700
1 mms182	<==			
3	<==			
2 tsip2	AGTGGCTGGT G			

FIG. 8 (fin)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, 15/86, 5/10, C07K 14/47, 14/82, A61K 39/395, 48/00, C12Q 1/68, G01N 33/574, 33/68		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/22695 (43) Date de publication internationale: 26 juin 1997 (26.06.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/02061 (22) Date de dépôt international: 20 décembre 1996 (20.12.96)		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(30) Données relatives à la priorité: 95/15146 20 décembre 1995 (20.12.95) FR 96/04853 18 avril 1996 (18.04.96) FR		(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 18 septembre 1997 (18.09.97)	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): FONDATION JEAN DAUSSET-CEPH [FR/FR]; 27, rue Juliette-Dodu, F-75010 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): TALERMAN, Adam [FR/FR]; 12, rue de la Chaise, F-75007 Paris (FR). AMSON, Robert [FR/FR]; 10, rue Gay-Lussac, F-75005 Paris (FR). COHEN, Daniel [FR/FR]; 3, rue de l'Orme-au-Mesnier, F-91600 Savigny-sur-Orge (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regime-beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			
(54) Titre: NUCLEOTIDE SEQUENCES, PROTEINS, DRUGS AND DIAGNOSTIC AGENTS FOR TREATING CANCER			
(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES, PROTEINES, MEDICAMENTS ET AGENTS DIAGNOSTIQUES UTILES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER			
(57) Abstract			
<p>A nucleotide sequence corresponding to a gene comprising (a) one of sequences SEQ ID 1 to 11, or an equivalent gene which comprises (b) a sequence hybridisable with one of the sequences of (a), (c) a sequence at least 80 % homologous with (a) or (b), or (d) a sequence coding for a protein encoded by a gene according to (a), (b) or (c), or for an equivalent protein, and the use thereof, in particular for controlling cancer as well as for therapeutic follow-up. These genes are in the TSAP (tumor suppressor activated pathway) group, designated TSAP 1 to TSAP 8 and TSAP 3 human (or HUMSIAH) and in TSIP (tumor suppressor inhibited pathway) group, designated TSIP 1 and TSIP 2, both types of genes corresponding to sequences activated or inhibited, respectively, during cellular apoptosis, particularly that induced by p53.</p>			
(57) Abrégé			
<p>La présente invention concerne une séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant: (a) une séquence selon l'une des IND. SEQ 1 à 11 ou un gène équivalent qui comporte: (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a), (c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou (d) une séquence codant pour une protéine codée par une gène selon (a), (b) ou (c) ou pour un protéine équivalente, et leur application notamment dans la suppression du cancer ainsi que dans le suivi thérapeutique. Ces gènes regroupés en TSAP (tumor suppressor activated pathway) et dénommés TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain (ou HUMSIAH), et en TSIP (tumor suppressor inhibited pathway) et dénommés TSIP 1 et TSIP 2, ces deux types de gènes correspondant respectivement à des séquences induites ou inhibées lors de l'apoptose cellulaire, notamment celles induites par p53.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten. Application No
PCT/FR 96/02061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC 6	C12N15/12 C12N15/86 C12N5/10 C07K14/47 C07K14/82
	A61K39/395 A61K48/00 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 28, 5 October 1993, pages 21318-21327, XP002013539 LEE: "Purification, molecular cloning and sequencing of phospholipase C-beta4" see the whole document	1,3,7,17
A	---	26
X	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 3, no. 3, 1994, pages 465-470, XP002013540 TODA: "Isolation and characterization of a novel gene encoding nuclear protein at a locus (D11S636) tightly linked to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)" see the whole document	4,7,17
A	---	26
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

12 June 1997

Date of mailing of the international search report

30.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int.	Application No
PCT/FR 96/02061	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEVELOPMENT, vol. 117, no. 4, 1993, pages 1333-1343, XP000601972 DELLA: "Isolation and characterization of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina)" see the whole document & DATABASE EMBL ID: MMSIAH1A, AC=Z19579, see the comparison or alignment of the nucleotide and protein sequences ---	1,3,7,17
A	FEBS LETT., vol. 374, no. 3, 6 November 1995, pages 384-386, XP002013541 GUENAL: "Studies of specific gene induction during apoptosis of cell lines conditionally immortalized by SV40" see the whole document ---	1-9,11, 15,26,31
A	WO 95 19367 A (LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION) 20 July 1995 see the whole document ---	1-27
A	WO 95 11301 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 27 April 1995 see the whole document ---	1-27
A	ONCOGENE, vol. 9, no. 12, 1994, pages 3743-3751, XP000602314 ZHAN: "Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis" see the whole document ---	1-27
Y	SCIENCE, vol. 257, 14 August 1992, pages 967-971, XP000508268 LIANG: "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction" cited in the application see the whole document ---	32
Y	NUCLEIC ACIDS REASEARCH, vol. 19, no. 14, 25 July 1991, page 4008 XP002013542 DON: ""Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification" cited in the application see the whole document ---	32
1		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 96/02061

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL ID: HS152227, AC= H72152, 2 November 1995 XP002019920 see the alignment of nucleotide and protein sequences; the descriptors & UNPUBLISHED, 1995, HILLIER ET AL.: ---	1,3,7, 17,26
A,P	DATABASE EMBL ID: HS49264, AC=N31049, 12 January 1996 XP002019921 see the alignment of nucleotide and protein sequences; the descriptors. & UNPUBLISHED, 1996, HILLIER ET AL.: ---	1,3,7, 17,26
P,X	PROC. NATL ACAD. SCI. , vol. 93, no. 9, 30 April 1996, pages 3953-3957, XP002032914 AMSON ET AL.: "Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis : activation of the vertebrate homologue of Drosophila seven in absentia gene" see the whole document ---	1-10,17, 19,21, 24,26,27
P,X	PROC. NATL ACAD. SCI. , vol. 93, no. 17, 20 August 1996, pages 9039-9042, XP000611649 NEMANI ET AL.: "Activation of the human homologue of the Drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression" see the whole document ---	1-3,5-7, 17,19,26
A	NATURE , vol. 375, 29 June 1995, pages 754-760, XP002032915 SHERRINGTON ET AL.: "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease" cited in the application see the whole document ---	1,8,10, 25,28,29
A	AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND JOURNAL OF MEDICINE , vol. 25, no. 6, December 1995, pages 845-851, XP000610669 DELLA N G ET AL.: "A COMBINED GENETIC AND BIOCHEMICAL APPROACH TO MAMMALIAN SIGNAL TRANSDUCTION" see the whole document -----	1,3,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internatinal Application No
PCT/FR 96/02061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9519367 A	20-07-95	US 5484710 A	16-01-96
WO 9511301 A	27-04-95	AU 7983294 A	08-05-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. : Internationale No
PCT/FR 96/02061

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 6	C12N15/12	C12N15/86	C12N5/10	C07K14/47	C07K14/82

A61K39/395 A61K48/00 C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	J. BIOL. CHEM., vol. 268, no. 28, 5 Octobre 1993, pages 21318-21327, XP002013539 LEE: "Purification, molecular cloning and sequencing of phospholipase C-beta4" voir le document en entier	1,3,7,17
A	---	26
X	HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 3, no. 3, 1994, pages 465-470, XP002013540 TODA: "Isolation and characterization of a novel gene encoding nuclear protein at a locus (D11S636) tightly linked to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)" voir le document en entier	4,7,17
A	---	26
	-/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "a" document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 Juin 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30.06.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gac, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 96/02061

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DEVELOPMENT, vol. 117, no. 4, 1993, pages 1333-1343, XP000601972 DELLA: "Isolation and characterization of murine homologues of the Drosophila seven in absentia gene (sina)" voir le document en entier & DATABASE EMBL ID: MMSIAH1A, AC=Z19579, voir la comparaison / l'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques ---	1,3,7,17
A	FEBS LETT., vol. 374, no. 3, 6 Novembre 1995, pages 384-386, XP002013541 GUENAL: "Studies of specific gene induction during apoptosis of cell lines conditionally immortalized by SV40" voir le document en entier ---	1-9,11, 15,26,31
A	WO 95 19367 A (LA JOLLA CANCER RESEARCH FOUNDATION) 20 Juillet 1995 voir le document en entier ---	1-27
A	WO 95 11301 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 27 Avril 1995 voir le document en entier ---	1-27
A	ONCOGENE, vol. 9, no. 12, 1994, pages 3743-3751, XP000602314 ZHAN: "Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis" voir le document en entier ---	1-27
Y	SCIENCE, vol. 257, 14 Août 1992, pages 967-971, XP000508268 LIANG: "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction" cité dans la demande voir le document en entier ---	32
Y	NUCLEIC ACIDS REASEARCH, vol. 19, no. 14, 25 Juillet 1991, page 4008 XP002013542 DON: ""Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification" cité dans la demande voir le document en entier ---	32
1		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. : Internationale No
PCT/FR 96/02061

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE EMBL ID: HS152227, AC= H72152, 2 Novembre 1995 XP002019920 voir l'alignements des séquences nucléotidiques et protéiques; les descripteurs & UNPUBLISHED, 1995, HILLIER ET AL.: ---	1,3,7, 17,26
A,P	DATABASE EMBL ID: HS49264, AC=N31049, 12 Janvier 1996 XP002019921 Voir l'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques; les descripteurs. & UNPUBLISHED, 1996, HILLIER ET AL.: ---	1,3,7, 17,26
P,X	PROC. NATL ACAD. SCI.. vol. 93, no. 9, 30 Avril 1996, pages 3953-3957, XP002032914 AMSON ET AL.: "Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis : activation of the vertebrate homologue of Drosophila seven in absentia gene" voir le document en entier ---	1-10,17, 19,21, 24,26,27
P,X	PROC. NATL ACAD. SCI.. vol. 93, no. 17, 20 Août 1996, pages 9039-9042, XP000611649 NEMANI ET AL.: "Activation of the human homologue of the Drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression" voir le document en entier ---	1-3,5-7, 17,19,26
A	NATURE, vol. 375, 29 Juin 1995, pages 754-760, XP002032915 SHERRINGTON ET AL.: "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset 'amilial Alzheimer's disease' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,8,10, 25,28,29
A	AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 25, no. 6, Décembre 1995, pages 845-851, XP000610669 DELLA N G ET AL: "A COMBINED GENETIC AND BIOCHEMICAL APPROACH TO MAMMALIAN SIGNAL TRANSDUCTION" voir le document en entier -----	1,3,7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem.	Internationale No
PCT/FR 96/02061	

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9519367 A	20-07-95	US 5484710 A	16-01-96
WO 9511301 A	27-04-95	AU 7983294 A	08-05-95

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						



D6

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

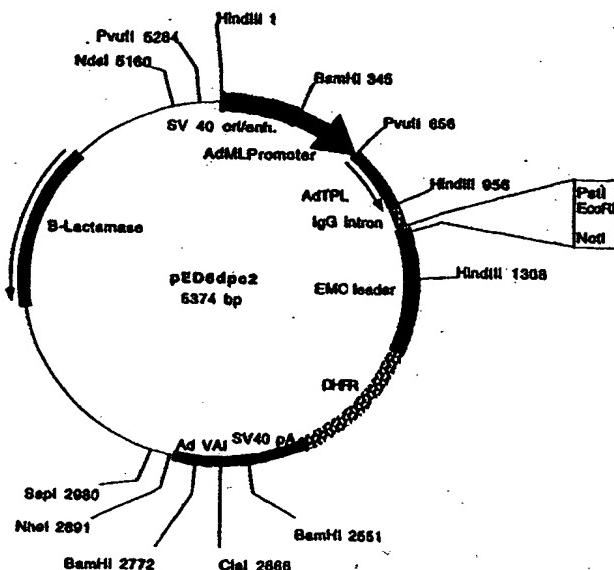
(51) International Patent Classification 6 :	A2	(11) International Publication Number: WO 98/42741
C07K 14/00		(43) International Publication Date: 1 October 1998 (01.10.98)

(21) International Application Number: PCT/US98/05972	(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) International Filing Date: 25 March 1998 (25.03.98)	
(30) Priority Data:	
08/825,145 25 March 1997 (25.03.97) US	
09/046,881 24 March 1998 (24.03.98) US	
(71) Applicant: GENETICS INSTITUTE, INC. [US/US]; 87 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140 (US).	
(72) Inventors: JACOBS, Kenneth; 151 Beaumont Street, Newton, MA 02160 (US). MCCOY, John, M.; 56 Howard Street, Reading, MA 01867 (US). LAVALLIE, Edward, R.; 113 Ann Lee Road, Harvard, MA 01451 (US). RACIE, Lissa, A.; 124 School Street, Acton, MA 01720 (US). MERBERG, David; 2 Orchard Street, Acton, MA 01720 (US). TREACY, Maurice; 93 Walcott Road, Chestnut Hill, MA 02167 (US). SPAULDING, Vikki; 11 Meadowbank Road, Billerica, MA 01821 (US). AGOSTINO, Michael, J.; 26 Wolcott Avenue, Andover, MA 01810 (US).	
(74) Agent: SPRUNGER, Suzanne, A.; Genetics Institute, Inc., 87 CambridgePark Drive, Cambridge, MA 02140 (US).	

(54) Title: SECRETED PROTEINS AND POLYNUCLEOTIDES ENCODING THEM

(57) Abstract

Novel polynucleotides and the proteins encoded thereby are disclosed.



Plasmid name: pED6dpc2
Plasmid size: 6374 bp

Comments/References: pED6dpc2 is derived from pED6dpc1 by insertion of a new polylinker to facilitate cDNA cloning. SST cDNAs are cloned between EcoRI and NotI. pED vectors are described in Kaufman et al.(1991), NAR 19: 4485-4490.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IL 98/00125

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9625941	A 29-08-1996	AU 5133296	A 11-09-1996	
		CA 2213484	A 29-08-1996	
		EP 0813419	A 29-12-1997	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)